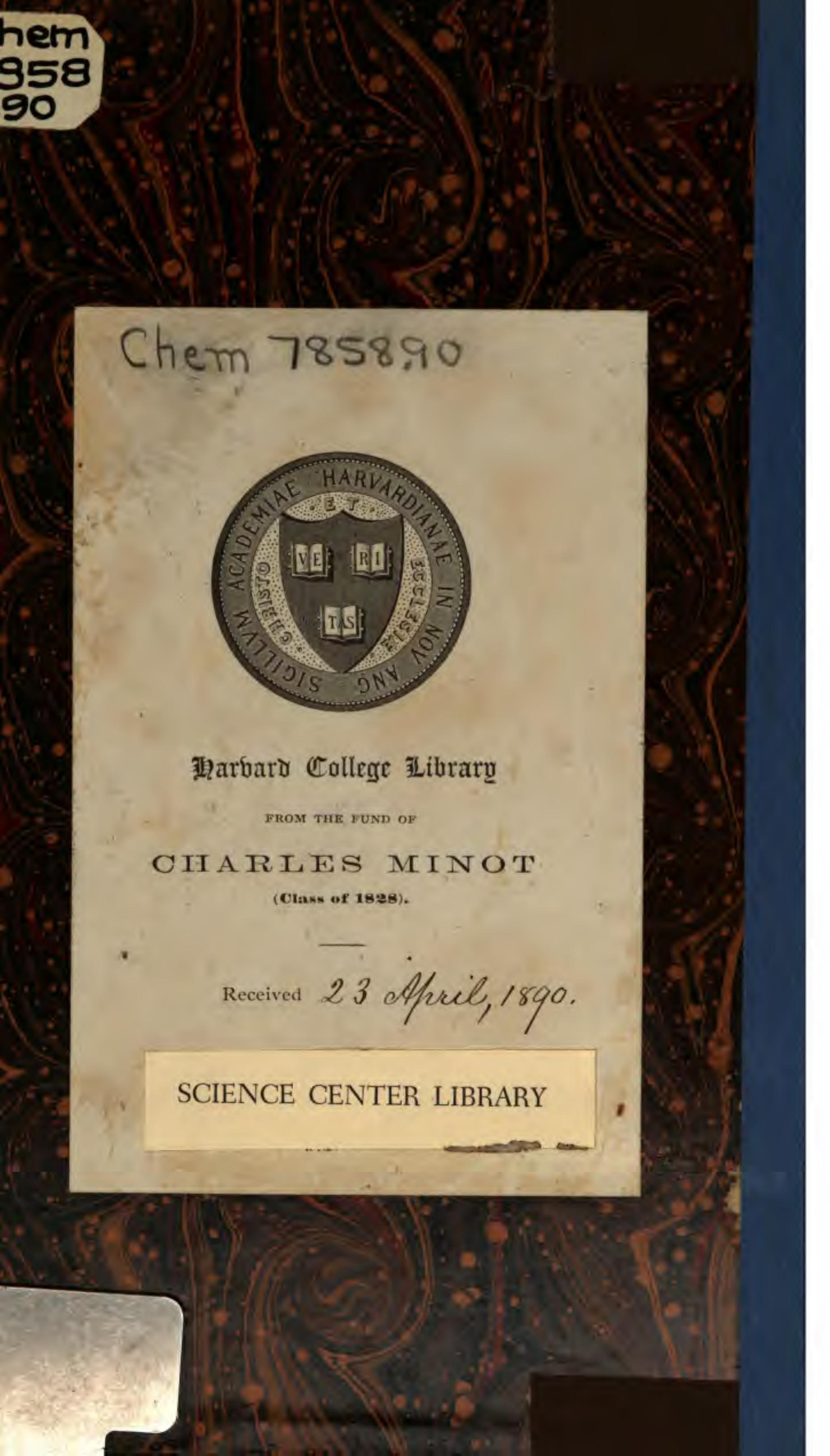










# Die Mikroorganismen
der
# Gärungsindustrie.

Von

**Alfred Jörgensen.**

**Zweite, vermehrte und verbesserte Auflage.**



**Mit 41 Textabbildungen.**

BERLIN.
VERLAG VON PAUL PAREY.
Verlagshandlung für Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwesen.
1890.

Herrn Dr. Karl Lintner,

Professor für Chemie und Technologie, Direktor der Kgl. bayer. landwirtschaftlichen Centralschule und des Staatsgutes Weihenstephan

in aufrichtiger Verehrung

gewidmet.

# Vorwort zur ersten Auflage.

Als Besitzer eines Laboratoriums für Gärungstechnik, dessen Aufgabe neben den auf diesem Felde vorkommenden Analysen darin besteht, eine Anleitung zur Untersuchung der in der Gärungsindustrie vorkommenden Mikroorganismen zu geben, vermisste ich ein kurzgefasstes Handbuch in dieser Richtung, welches unter anderem dazu dienen konnte, als Leitfaden beim Unterrichte benutzt zu werden.

Das vorliegende Buch ist ein Versuch dieser Art, und mein Ziel war also wesentlich ein Supplement zu den allgemein bekannten und benutzten Lehrbüchern in den verschiedenen Zweigen der Gärungsindustrie zu geben. Unter den derartigen Werken hebe ich, als Vorbilder für gute Lehrbücher, besonders hervor: LINTNERs Lehrbuch der Bierbrauerei, THAUSINGs Theorie und Praxis der Malzbereitung und Bierfabrikation und MAERCKERs Handbuch der Spiritusfabrikation. Es liegt in der Natur der Sache, dass diese Bücher wesentlich vom chemischen Standpunkte aus geschrieben sind, da die historische Entwickelung bisher die Chemie in erster Linie unter den Hülfswissenschaften des Faches gestellt hat. Im letzten Dezennium trat eine neue Seite der Forschung hinzu, die botanisch-physiologische, welche schon dargethan hat, dass bedeutungsvolle Resultate für die Praxis auf diesem Wege erzielt werden können. Die Litteratur, welche hierüber vorliegt, und die Arbeit, welche gefordert wird, um sich in diese neue Forschungsrichtung hineinzuleben, sind schon so umfassend, dass sich eine Teilung der Arbeit notwendig zeigte, und es kann daher den Verfassern der vorliegenden Lehrbücher nicht zur Last gelegt werden, dass

sie fortwährend dieser Seite der Sache eine ziemlich stiefmütterliche Behandlung gewährten.

Meine Bestrebungen gingen ferner darauf hin, ein populäres Buch im guten Sinne des Wortes zu geben, mit der besonderen Begrenzung, aus der überaus grossen Litteratur, welche schon entstanden ist, nur das herauszuwählen und darzustellen, was für die Kenntnis der für die Industrie wichtigsten Mikroorganismen notwendig ist.

Die einleitenden Bemerkungen über die wissenschaftlichen Untersuchungsmethoden sollen aufgefasst werden: teils als vorläufige Anleitungen zu den gärungsphysiologischen Untersuchungen, teils als Auseinandersetzungen, deren Auffassung die Bedingungen für das rechte Verständnis des eigentlichen Inhaltes des Buches sein können.

Wie bekannt, liegen schon Bücher vor, in welchen die hervorragendste Litteratur über Mikroorganismen gesammelt ist. Meine Arbeit unterscheidet sich doch wesentlich von diesen dadurch, 1. dass sie nicht nur die Bakterien, sondern auch die Schimmel- und Hefenpilze behandelt und 2. dass sie, wie angegeben, ganz speziell auf die Gärungsindustrie Rücksicht nimmt.

Bei der Bearbeitung wurde die ganze neue Litteratur benutzt und selbstverständlich besonders die in mehreren Beziehungen bahnbrechenden Arbeiten, welche wir Dr. E. CHR. HANSEN (Carlsberg Laboratorium) verdanken. Unter den mannigfaltigen Mitteilungen, welche dieser Forscher mir im Laufe der Jahre gegeben hat, finden sich auch einige Beobachtungen, welche hier mit seiner Erlaubnis zum ersten Male publiziert werden. Ich bringe ihm hierfür meinen verbindlichsten Dank.

Kopenhagen, März 1886.

**Alfred Jörgensen.**

# Vorwort zur zweiten Auflage.

Nachdem die erste Auflage dieses Buches binnen drei Jahren vergriffen war, musste für eine zweite Auflage eine vollständige Umarbeitung durchgeführt werden.

Als Hilfe dazu diente die vor kurzem von Dr. G. H. MORRIS herausgegebene englische Ausgabe[1]) meines Buches, in welcher ich eine Reihe neuer Beobachtungen bereits aufgenommen hatte. Da aber das Manuskript der englischen Ausgabe schon vor längerer Zeit abgeschlossen war, so wurde für diese zweite deutsche Ausgabe trotzdem eine bedeutende Umarbeitung nötig; dieselbe tritt somit auch im Vergleiche mit der englischen als eine vollständigere auf.

Bekanntlich hat E. CHR. HANSENs System der Hefereinzucht eine Reform im Brauwesen hervorgerufen, welche für die Untergärung in den meisten Ländern eingeführt wurde; in den Obergärungs-Brauereien sowie in den anderen Zweigen der Gärungsindustrie wurde der Anfang zu diesem Fortschritte gemacht. Gleichzeitig damit, dass diese Reform sich in der Praxis mehr und mehr verbreitete, hat HANSEN zugleich mit aller Kraft seine theoretischen, gärungsphysiologischen Forschungen fortgeführt, und seit dem Jahre, da die erste Ausgabe dieses Buches erschien, hat er eine bedeutende Reihe von neuen Untersuchungen publiziert. Diese einerseits theoretischen, andererseits praktisch-technischen Arbeiten gaben den Impuls zu einer ganzen Litteratur, und alles wesentliche in dieser wurde in der vorliegenden zweiten Ausgabe

---

1) ALFRED JÖRGENSEN, The micro-organisms of fermentation, practically considered. By Dr. G. HARRIS MORRIS. Publ. by F. W. LYON, Eastcheap-buildings, London 1889.

berücksichtigt. Sie dürfte somit den Vorzug haben, zum ersten Male eine Übersicht über die Resultate der sämtlichen wesentlichsten Arbeiten, die wir der von HANSEN repräsentierten Richtung in der Gärungsphysiologie und Gärungstechnik verdanken, zu geben.

Ich habe selbstverständlich auch die Resultate von den anderen Forschungsmethoden mit in meiner Darstellung hineingezogen, namentlich mehrere wichtige Arbeiten über Bakterien, welche während der letzten Jahre erschienen sind. Mein Ziel war überhaupt, ein Gesamtbild von unseren Kenntnissen auf diesem Gebiete zu geben. Um eine leichtere Übersicht über das reichgliedrige Material zu geben, habe ich für diese Ausgabe ausführliche Register ausgearbeitet.

Ich hoffe daher, dass mein Buch in der jetzigen Bearbeitung ein nützliches Hilfsmittel für diejenigen sein wird, welche sich mit dem Studium der Fermentorganismen beschäftigen.

Durch die Güte der Herren Dr. HANSEN, HOLM und PETERSEN konnte ich mehrere Mitteilungen über neue, noch nicht publizierte Untersuchungen verwenden.

Ich spreche diesen Herren und allen Denjenigen meinen besten Dank aus, welche mir bei meiner Arbeit Unterstützung geleistet haben, teils öffentlich in den vielen wertvollen Rezensionen der ersten Ausgabe meines Buches, teils durch private Mitteilungen, teils endlich durch Zusendung von Abhandlungen und Büchern.

Schliesslich danke ich bestens dem Verleger Herrn PAUL PAREY für die gute Ausstattung meines Buches.

Kopenhagen, Herbst 1889.

Alfred Jörgensen.

# Inhalt.

Seite

## 4. Kapitel. Die Schimmelpilze.



## 5. Kapitel. Die Alkoholgärungspilze.

### 6. Kapitel. Die Anwendung der Resultate der wissenschaftlichen Forschung in der Praxis.



# 1. Kapitel.

## Die mikroskopische und physiologische Untersuchung.

---

Das Mikroskop wird zu allen Zeiten das erste Hilfsmittel zur Untersuchung der Mikroorganismen sein, da dieselben als Individuen fast immer für das blosse Auge unsichtbar sind. Die ersten grossen bedeutungsvollen Beobachtungen in der Gärungsphysiologie verdanken wir den rein mikroskopischen Untersuchungen, und erst in den letzten Decennien trat die biologische und physiologische Untersuchung zu. Nachdem eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür gefunden war, dass dieselbe Art von Mikroorganismen nicht immer in derselben Form auftritt, begann an verschiedenen Orten eine eifrige Arbeit mit sogenannten „Kulturversuchen", indem man durch künstlich hervorgebrachte Wachstumsbedingungen erstrebte, die verschiedenen Entwickelungsstufen an demselben Orte vor sich gehen zu sehen, um so sämtliche Phasen fixieren zu können. Der Gedanke war richtig, die Ausführung dagegen zu jener Zeit so verfehlt, dass die „Kulturversuche" dadurch in vollständigen Misskredit zu geraten drohten. Man ging zur Arbeit ohne jegliche Kritik, wie das folgende Beispiel zeigt: Es wurde auf einer feuchten Brotscheibe Bierhefe ausgesät; die Kultur wurde mit einer Glasglocke vorsichtig zugedeckt, und man beobachtete alle überhaupt möglichen Vorsichtsmassregeln, um die Vegetation vor von aussen eindringende Körpern zu schützen. Nach einigen Tagen entwickelte sich, wie immer auf feuchten Brotscheiben, eine Schimmelvegetation, und man zog daraus den Schluss, dass die Bierhefe der Ursprung der Schimmelformen sei, dass folglich Hefe und Schimmelpilz Entwicklungsglieder derselben Art wären. —

Es verlief eine Reihe von Jahren, bevor man die, wie es scheint, ganz selbstverständliche Forderung an derartige Untersuchungen stellte, dass man sich zuerst darüber vergewissert: von wo man ausgeht, ehe man die Schlussfolgerungen zieht. Diese Forderung wurde nach und nach schärfer präzisiert, und wir werden sehen, dass man hier auf unserem Gebiete im engsten Sinne erreichte, diesen Anspruch in höherem Grade als in den übrigen naheliegenden Wissenschaftszweigen zu befriedigen.

Zur Untersuchung der Mikroorganismen wird als Regel ein Mikroskop, welches eine Vergrösserung bis 1000fach gewährt, notwendig sein. Für die Hefenpilze und Schimmelformen besteht die ganze Präparation gewöhnlich darin, dass ein Tropfen der Flüssigkeit, worin sich die Organismen befinden, auf dem Objektglase angebracht und mittelst des Deckgläschens zu einer dünnen Schicht ausgebreitet wird. Wurden sie auf festem Substrate kultiviert, so wird eine sehr geringe Menge vorerst in einem Wassertropfen verteilt. Für die Bakterien muss die Untersuchung jedenfalls auch immer zuerst in dieser Weise geschehen. In der neueren Bakterienforschung und namentlich für die pathogenen Formen wird eine Menge verschiedener Eintrocknungs- und Färbungsmethoden benutzt, teils um die Beobachtung zu erleichtern, teils um Charaktere hervorzubringen, welche sonst schwierig oder gar nicht beobachtet werden können. Gegen diese Methoden wurde der ohne Zweifel berechtigte Einwand gemacht, dass die gewaltsame Einwirkung oft gewisse Verhältnisse bei den Bakterien verrückt, z. B. die Längen- und Dickenproportion. Dem gegenüber muss geltend gemacht werden, besonders hinsichtlich gewisser Krankheitsformen, z. B. des Tuberkulosebacillus, dass es zufolge der Beobachtung KOCHs erst nach einer solchen Präparation möglich war, diese Organismen sicher zu bestimmen, und die Färbung oft notwendig ist, um die Bacillen überhaupt auffinden zu können. Als Beispiel der Färbungsmethoden gehe ich etwas genauer auf die Untersuchung des Tuberkulosebacillus ein, welche zu einer der wichtigsten Beobachtungen in der neueren Medizin führte. KOCH gab für die Untersuchung folgende Methode an: Der Schnitt des Gewebes, worin die Bacillen sich befinden, wird 24 Stunden in eine Mischung von 200 Teilen destillierten Wassers, 1 Teil konzentrierter alkoholischer Methylenblaulösung und

0,2 Teilen Kalilauge von 10 pCt. eingelegt. Er ist hierdurch dunkelblau gefärbt und kommt so für 15 Minuten in eine konzentrierte wässerige Lösung von Vesuvin. Danach wird er in destilliertem Wasser abgespült, bis die blaue Farbe geschwunden und eine mehr oder weniger starke braune Tinktion zurückgeblieben ist; schliesslich wird er in Alkohol entwässert, in Nelkenöl aufgehellt und so untersucht. Die Zellkerne und die meisten Arten der Mikrokokken sind dann braun gefärbt, die Tuberkelbacillen dagegen intensiv blau. (Unter den bekannten Bacillen verhalten sich nur die Leprabacillen ähnlich, unterscheiden sich aber in anderer Richtung von den Tuberkelbacillen.) Nach KOCHs Ansicht kam es hier auf die alkalische Reaktion der Farblösung an, da diese Bacillen in sauren oder neutralen Flüssigkeiten nie gefärbt werden; die neutrale Lösung eines anderen Farbstoffes verdrängt dann die erste Färbung überall mit Ausnahme der Tuberkelbacillen, welche die ursprüngliche Färbung behalten. — Es wurden später mehrere andere Methoden zur Bestimmung dieses Mikroorganismus aufgestellt; darunter bewährte sich die hier zu beschreibende EHRLICHsche als die vorzüglichste. Dieser Forscher verwendete statt Kalilauge das Anilin, eine schwach gelblich gefärbte, ölartige Flüssigkeit, dessen gesättigte wässerige Lösung mehr Farbstoff als die Kalilösung aufzunehmen vermag; ferner hat er mineralische Säuren zur Entfärbung benutzt, indem er von der Voraussetzung ausgeht, dass die Tuberkelbacillen von einer Hülle umgeben sind, welche nur für alkalisch reagierende Flüssigkeiten durchdringlich ist. Wenn nun durch die alkalische Farblösung Bacillen, Zellkerne, Plasma u. s. w. tingiert und die erstgenannten folglich in dieser Mischung schwer zu finden sind, so wird eine Säure die Farbe aus allen übrigen Partieen und aus allen fremden Mikroorganismen herausziehen; da die präsumierte Hülle der Tuberkelbacillen aber für die Säure undurchgängig ist, so werden diese jetzt in dem sonst völlig entfärbten Präparate als die einzigen gefärbten Körper übrig bleiben. EHRLICH führt die Färbung in folgender Weise aus: Fein pulverisiertes Gentianaviolett wird in einer gesättigten Lösung von Anilin in Wasser gelöst. Hiervon werden in ein Uhrschälchen 10—20 Tropfen abfiltriert; in das Schälchen wird die zu untersuchende Schicht etwa 24 Stunden eingelegt; hiernach wird sie mit destilliertem Wasser abgespült

und danach wieder in das Schälchen mit einer Lösung von z. B. 3 Teilen Salpetersäure und 100 Teilen Alkohol eingelegt. Nach 3—5 Minuten ist der Schnitt entfärbt, das Präparat kommt jetzt in reinen Alkohol und wird endlich in Nelkenöl untersucht.

Wie bekannt, wurden in der neuesten Zeit sehr oft — zum ersten Male wohl von R. KOCH — photographische Abbildungen der Bakterien benutzt. Um diese darzustellen, sind Färbungen und Entfärbungen ganz notwendig, teils um die Konturen der Bakterien schärfer hervortreten zu lassen, teils um alle störenden Körper vom Bilde zu entfernen.

Für gärungsphysiologische Zwecke, wo die Organismen fast immer frei liegen und nur selten mit störenden Elementen vermischt sind, sind solche Färbungen und Entfärbungen gewöhnlich nicht notwendig, und nur in wenigen Fällen führte eine Färbung zu Speciescharakteren (cfr. Bacterium aceti und B. Pasteurianum).

Es ist dagegen bei der Untersuchung von Gärungsorganismen und namentlich der Bakterien bisweilen notwendig, eine andere Art von Präparation vorzunehmen. Die in den Flüssigkeiten auftretenden Sekrete organischer und unorganischer Natur haben oft eine täuschende Ähnlichkeit mit den verschiedenen Bakterienformen, und speciell ist es oft mit den grössten Schwierigkeiten verbunden oder auch selbst für den geübtesten Beobachter unmöglich, mit Sicherheit zu bestimmen, ob die im Gesichtsfelde liegenden kleinen kugelförmigen Körper entweder Kugelbakterien oder Sekrete der Flüssigkeit sind. Bevor man in solchen zweifelhaften Fällen zur später zu beschreibenden physiologischen Untersuchung schreitet, ist es zweckmässig, die mikrochemischen Reagentien anzuwenden, welche oft gute vorläufige Winke geben können. Im Biere und überhaupt in Nährflüssigkeiten, welche Eiweissstoffe enthalten, treten diese oft als kugelige und fadenförmige Ausscheidungen auf, und ebenso können auch die Stärkekörner und die von der Stärke gebildeten Dextrine und endlich einige der Hopfenbestandteile als feine kugelige Körper erscheinen. Ein geringer Zusatz von Alkohol, Äther, Chloroform, Essigsäure, Natron, Kali u. s. w. wird hier einige Aufklärung geben können, indem z. B. die harzartigen Stoffe von den erstgenannten Flüssigkeiten, die eiweissartigen Ausscheidungen mehr oder weniger von den letztgenannten Flüssigkeiten angegriffen

werden; ein Zusatz von Jod wird die gegenwärtigen Stärkekörner als blaue Punkte zeigen, und gewisse Dextrine werden vom Jod rötlich gefärbt.

Bei den höheren Gärungsorganismen, Hefen- und Schimmelpilzen, werden Färbungen zu einem anderen Zwecke verwendet, nämlich um darüber Kenntnis zu erhalten, welche Stoffe sich in der Wand oder dem Inhalte der Zelle auf den verschiedenen Entwickelungsstadien finden. Setzt man z. B. eine Lösung von Eisenchlorid oder einem anderen Eisensalze zu Zellen, welche Gerbsäure enthalten, dann tritt in diesen Zellen eine schwarzblaue oder grüne Färbung ein; es wurde in dieser Weise beobachtet, dass die Zellen von Saccharomyces cerevisiae im ersten Stadium der Gärung eine merkliche Menge von Gerbsäure enthalten. Werden Hefezellen mit einer Lösung von Haematoxylin oder Überosmiumsäure behandelt, dann kann man einen kleinen, scharf begrenzten, dunkel gefärbten Körper wahrnehmen, welcher als ein Zellkern von derselben Art sich deuten lässt, wie er bei der überwiegenden Mehrzahl von Pflanzen gewöhnlich ohne vorhergehende Präparation beobachtet wird.

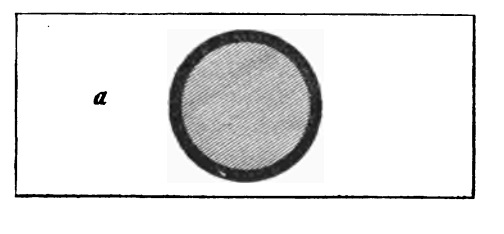
Eine wirklich eingehende Kenntnis zu den Gärungsorganismen wird jedoch erst dann erreicht, wenn die physiologische Untersuchungsmethode hinzutritt. Wie früher angedeutet, wurden in einer jetzt zurückgelegten Periode Anstrengungen gemacht, um Methoden dieser Art hervorzubringen; der vollständige Mangel an Kritik in der Ausführung der Versuche bewirkte jedoch, dass diese gänzlich misslangen, und es trat eine Reaktion ein, welche u. a. darin einen Ausdruck findet, dass REESS in seiner Arbeit über die Ascosporen bei den Saccharomyceten (1870) ausdrücklich hervorhebt, dass er keine Vorsichtsmassregel nahm, um Reinkulturen zu erreichen — bis zu solchem Grade waren diese Kulturen in Misskredit geraten. Im Laufe der folgenden Jahre nahm jedoch die Sache eine andere Wendung, und es ist vielleicht eine beinahe einzig dastehende Thatsache in der Geschichte der Wissenschaften, dass eine neue Forschungsrichtung in so kurzer Zeit sich nicht nur den Weg gebahnt, sondern auch, sowohl auf dem pathologischen als auf unserem speciellen Gebiete schon praktische Resultate erreicht hat, welche eine Revolution in vielen bisher festgestellten Dogmen hervorgerufen haben.

Die physiologische Untersuchung der Mikroorganismen hat zum Zweck eine Einsicht in die Entwicklung und Lebensthätigkeit dieser Wesen zu erwerben. Das Mittel dazu ist selbstverständlich, solche Bedingungen für ihr Wachstum und ihre Vermehrung herzustellen, dass man die nach und nach eintretenden Veränderungen des Organismus und der Stoffe, welche davon beeinflusst werden, wahrzunehmen vermag. Insofern man nur erstrebt, eine Kenntniss der verschiedenen Formen zu gewinnen, mit welchen der betreffende Organismus während seiner Entwickelung auftreten kann, werden die Bedingungen bedeutend leichter, als wenn man eine Kultur im grossen von Individuen, welche alle nachweislich von einer Zelle der Species abstammen, fordert, um durch physiologische, chemische oder rein praktische Versuche mit grösseren Mengen dieser Organismen eine Einsicht in die Relation zwischen ihren Formen und den äusseren Einwirkungen sowie in ihre ganze Lebenswirksamkeit zu erreichen. Im ersteren Falle verlangt man nur eine Kultur, in welcher der Organismus im stande ist, sich ungestört entwickeln zu können, ganz abgesehen davon, ob sich in demselben Präparate ganz fremde Individuen oder Arten finden. Im letzteren Falle dagegen wird eine absolute Reinkultur gefordert. Einige Beispiele werden dies näher beleuchten.

Einer der Naturforscher, welcher die ausführlichsten Beiträge zur Naturgeschichte der Schimmelpilze gegeben hat, ist BREFELD. Um sich zu vergewissern, dass er die ganze Entwickelung eines solchen Schimmelpilzes aufgeklärt hatte, fixierte er unter dem Mikroskope direkt eine Spore dieser Pflanze, brachte sie zur Keimung und folgte genau dem Wachstum der keimenden Spore, bis diese wieder Sporen hervorbrachte. Die Zellen wurden in einem Tropfen von Nährflüssigkeit verteilt, und um die Austrocknung der Flüssigkeit zu verhindern, wurde in einigen Fällen eine geringe Menge von Gelatine zugesetzt, welche gleichzeitig die kleinen Körper daran hinderte, sich so leicht zwischen einander zu verschieben, wie im dünnflüssigen Substrate. Unter dem Mikroskope wurde dann auf einer einzelnen Zelle eingestellt, und die Arbeit bestand jetzt darin, mit Sorgfalt und Ausdauer alle den Veränderungen zu folgen, welche mit dieser Zelle vor sich gingen. Es war begreiflicherweise ganz gleichgültig, ob sich

in anderen Partieen des Tropfens Zellen von anderer Art befanden, z. B. Bakterien, sofern diese in das Wachstum des gewählten Objektes nicht störend eingriffen. Nach und nach wurden Zeichnungen der kleinen Pflanze, welche hervorwuchs, aufgenommen, und in dieser Weise sind denn die mannigfaltigen Abbildungen der Schimmelpilze, welche wir diesem Verfasser verdanken, entstanden. Diese Forschung war also rein botanischer Natur.

Kulturen der gleichen Art können oft Aufklärungen geben, wenn der früher erwähnte Fall vorliegt: Eine Nährflüssigkeit, in welcher Sekrete verschiedener Art eine mehr oder weniger täuschende Ähnlichkeit mit verschiedenen Bakterienformen angenommen haben, so dass man bei der allgemeinen mikroskopischen Untersuchung keine sichere Kenntnis erlangen kann. Man bringt dann einen Tropfen der Flüssigkeit in die sogenannte feuchte Kammer, z. B. RANVIERs (Fig. 1). Dieser Apparat wird dadurch hergestellt, dass in der Mitte eines gewöhnlichen Objektträgers eine sehr schwache Vertiefung geschliffen ist; um diese Vertiefung herum geht eine noch tiefere Furche, welche dazu bestimmt ist, Wasser aufzunehmen; der Tropfen von Nährflüssigkeit, welcher ganz klein sein muss, wird mitten in der seichten Vertiefung angebracht und mit einem Deckglase, welches über die Furche hinaus ragt, bedeckt; nach dem Auflegen wird das Deckglas mittels Vaseline festgekittet, und der Tropfen ist so zwischen dem Deckglas und der seichten Vertiefung des Objektträgers ausgebreitet und durch das Wasser in der Furche vor Verdunstung geschützt.



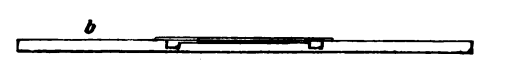




Fig. 1.
RANVIERs feuchte Kammer.
*a* von der Fläche, *b* von der Seite gesehen.

Eine andere Art von feuchten Kammern, die sogenannten

BÖTTCHERschen, werden dadurch hergestellt, dass auf einem gewöhnlichen Objektglase ein Glasring festgekittet ist. In diesem Raume werden einige Tropfen Wasser angebracht. Ein Deckgläschen, welches an der unteren Seite den kleinen Tropfen Nährflüssigkeit mit den Organismen trägt, wird am Rande des Glasringes durch Vaseline festgesetzt.

Man bringt nun einen solchen Apparat unter dem Mikroskope an und beobachtet von Zeit zu Zeit die Veränderungen der Körper, oder er wird in einen Brutkasten bei passender konstanter Temperatur gestellt, aus welchem in Zwischenräumen er zur miksoskopischen Durchmusterung hervorgenommen wird. Die lebenden Bakterien werden dann, wenn ihnen die Nährflüssigkeit und Temperatur zusagt, sich durch ihr Wachstum und ihre Vermehrung von dem organischen oder unorganischen Detritus unterscheiden.

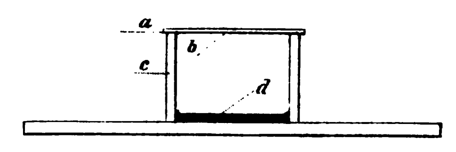



Fig. 2.
BÖTTCHERS feuchte Kammer.
*a* Deckgläschen, *b* Nahrungsschicht, *c* Glasring, *d* Flüssigkeit.

Die oben beschriebene Kultur BREFELDs war für morphologische Beobachtungen am Mikroskoptische eingerichtet; sobald aber die Aufgabe ist, eine physiologische Untersuchung auszuführen, so wird die Forderung gestellt, dass die Reinkulturen zugleich zu Massenkulturen entwickelt werden sollen. Es sind namentlich PASTEUR, NÄGELI, KOCH und HANSEN, welche in dieser Richtung die Methode entwickelt haben, und wir werden jetzt kurz deren Hauptzüge hervorheben.

Eine jede Gährung, gleichviel ob Bier, Wein, Spiritus, Essig oder andere Stoffe erzielt werden, ist eine Kultur von lebenden Organismen, von „organisierten Fermenten“, und die Bestrebungen der Fabrikanten gehen — mehr oder weniger bewusst — darauf hin, eine, soweit es die praktischen Verhältnisse erlauben, reine Kultur der für die Fabrikation günstigen Formen zu erreichen. Obgleich man in unserer Zeit, mit besserem Verständnisse der Mittel und der Ziele, grosse Fortschritte in dieser Richtung gemacht hat, werden sich doch gewiss immer Grenzen aufstellen lassen, welche aus rein praktischen Gründen nicht überschritten

werden können: die Kulturen in der Praxis werden nie dazu kommen, dass sie fortwährend „absolute Reinkulturen“ sind. Es ist aber einer der am meisten hervorspringenden Punkte in der gegenwärtigen Entwickelung der Gärungsindustrie, dass man mit richtigem Verständnisse der Bedeutung der Gärungsorganismen als des Centralen im Betriebe nach dem Ziele hin arbeitet, in immer höherem Grade die hauptsächlich arbeitenden nützlichen Arten von der Einwirkung der schädlichen Formen zu emanzipieren. Dass hierauf das allergrösste Gewicht liegt, wurde besonders einleuchtend, da HANSEN durch die planmässig ausgewählten Rassen der Unterhefe zeigte, dass eine solche für sich entwickelte reine Vegetation eine weit grössere Sicherheit und Gleichartigkeit in den Betrieb einführt. Zu diesem Punkte werden wir später zurückkommen.

Bei den Versuchen im Laboratorium, wo es sich ebenfalls um die Entwickelung von Kulturen der Gärungsorganismen handelt, werden höhere Forderungen als in der Praxis gestellt. Die Forderung ist hier, immer mit absoluten Reinkulturen zu arbeiten, teils in kleineren Mengen, teils in so grossen Massen, dass sie zu einem gegebenen Zeitpunkte den Versuchsraum verlassen können, um in den Betrieb übergeführt zu werden. Solche Bedingungen, welche in der Praxis vermisst werden, sucht man dann im Laboratorium, welches speciell für diese Untersuchungen eingerichtet ist, zu realisieren, und wir werden jetzt in kurzem diese Ansprüche und die Art und Weise, wie sie erfüllt werden, angeben, indem wir aus rein historischen Gründen mit dem letzten Gliede beginnen: den Gefässen und Flüssigkeiten, welche die ursprünglich hergestellte kleine Reinkultur empfangen, und den Hilfsmitteln, welche bei der Züchtung in Verwendung kommen. Man verlangt von diesen Elementen, dass sie vor dem Empfange der Aussaat steril, d. h. von allen lebenden, entwickelungsfähigen Keimen befreit sind, ferner, dass die übrigen Geräte und die Luft im Arbeitsraume so wenig lebende Keime als möglich enthalten. Dasselbe gilt begreiflicherweise auch für die Bekleidung und die Hände des Arbeitenden.

Eine solche Sterilisation und Desinfektion ist selbstverständlich von ganz anderer Art als die chemische Reinigung. Sie kann und muss in verschiedener Weise ausgeführt werden.

Solche Gegenstände, deren Beschaffenheit eine Erwärmung erlaubt, welche bedeutend über den Kochpunkt hinausgeht, z. B. eine Erwärmung bis zu ca. 150° C. in zwei Stunden, können nachweislich dadurch keimfrei gemacht werden; die metallenen Geräte, wie Zangen, Pincetten u. s. w. und ebenso gläserne Apparate können schnell sterilisiert werden durch Glühen oder durch starkes Erhitzen in einer Flamme und danach folgende Abkühlung in einem keimfreien Raume. Apparate von brennbaren Stoffen können durch wiederholtes schnelles Durchziehen durch eine Flamme an der Oberfläche keimfrei gemacht werden. Sie müssen vorher gründlich mechanisch gereinigt werden. Für die Nährflüssigkeiten wird ein Kochen der gewöhnlichen Art und von einer Dauer, welche sich nach der Beschaffenheit der Flüssigkeit richtet — z. B. nach den Stoffen, welche zur Herstellung benutzt wurden — Sterilität hervorbringen können. Als vorzügliches Sterilisierungmittel für flüssige und feste Nährsubstrate und Gefässe müssen Wasserdämpfe genannt sein, entweder strömend oder durch den sogenannten Autoclaven (PAPINschen Topf) mit Spannung von 110°—120° C. Es gilt, während der Abkühlung solche Dispositionen zu treffen, dass nur keimfreie Luft mit dem sterilisierten Körper in Berührung kommt; hierüber später. Es ist bekannt, dass die vegetativen Entwickelungsstufen der Bakterien einer Erwärmung von 100° C. nicht widerstehen können; dagegen sind die Sporen mehrerer Arten bedeutend resistenter. Es erfordert oft ein Kochen von mehreren Stunden, ehe sie getötet werden. Ganz merkwürdig zeigte sich, dass, wenn man die Sporen des Heubacillus einem kurzen Kochen unterwirft, sie dadurch zu einer kräftigeren Keimungsenergie als sonst stimuliert werden.

Gewisse Flüssigkeiten vertragen keine Erwärmung bis zum Kochpunkte, indem hierdurch solche Veränderungen in ihrer Zusammensetzung eintreten, dass sie schliesslich unverwendbar werden. Dies ist z. B. der Fall mit dem zum Bakteriumstudium verwenwendeten Blutserum, welches im gelatinösen Zustande benutzt wird. Dieser Stoff, auf 100° C. erwärmt, wird dünnflüssig, ohne wieder zu erstarren und man ist daher genötigt, einen anderen Weg einzuschlagen, um es sterilisiert im gelatinösen Zustande zu erhalten. Es wurde beobachtet, dass schon eine Erwärmung auf 58—62° C. hinlänglich war, um die vegetativen Bakterien, welche sich im Blut-

serum entwickeln, zu töten. Bei dieser Behandlung des Stoffes bleiben nur die Bakteriensporen lebendig zurück. Stellt man das gelatinierte Serum auf ein paar Tage in den Thermostaten hinein bei einer für die Entwickelung der Sporen günstigen Temperatur von ca. 30° C., dann wird der grösste Teil der Sporen keimen, und man kann danach die neuen vegetativen Fäden durch ein neues Erwärmen bei ca. 60° C. töten. Wiederholt man diesen Prozess einige Male, dann wird die gelatinöse Masse, sofern die Luftkeine keinen Zutritt erhalten, sich unbegrenzte Zeit steril erhalten können. Dieser Vorgang, welcher auch zum Sterilisieren der Milch benutzt wird, und der von TYNDALL erfunden wurde, ist von R. KOCH genauer begründet[1]).

Eine andere Weise, die störenden Keime zu töten, ist die Anwendung desinfizierender Stoffe, welche als Gift auf die Organismen einwirken. Nicht wenige dieser Stoffe fanden auch im praktischen Betriebe Verwendung. Die Grenze für die Anwendung solcher giftigen Stoffe muss in jedem einzelnen Falle bestimmt werden. Da Manipulationen mit solchen Giften auf den Arbeitenden schädlich wirken können, so ist die Aufgabe festzustellen, in wie starker Verdünnung sie benutzt werden können, um volle Dienste zu leisten. In Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte I, 1881 hat R. KOCH die Resultate einer bedeutenden Reihe solcher Untersuchungen gegeben, welche in hygienischer Hinsicht veranstaltet wurden. Die verschiedenen Desinfektionsmittel wurden auf ihre Fähigkeit die Bakteriensporen,

---

1) Wie gesagt wird eine solche Sterilisation auch in der Praxis teilweise angestrebt. Vor allem soll hervorgehoben werden, dass es möglich ist, die Würze steril in die Gärbottiche hineinzuführen. Absolut frei von fremden Keimen kann sich die Würze hier unter den Gärungen in offenen Bottichen nicht erhalten, aber sehr viel kann, bei richtigem Verständnisse der Sache, dazu beigetragen werden. Der einsichtsvolle Praktiker wird immer dafür Sorge tragen, dass die Luft im Gärungsraume durch reine Oberflächen so keimfrei wie möglich gehalten wird, dass die Bottiche rein sind, und dass alle Apparate, welche in die gärende Flüssigkeit hineingetaucht werden — Thermometer, Schaugläser u. s. w. — immer vollständig rein sind. Es versteht sich von selbst, dass alle diese Vorsichtsmassregeln erst jetzt wirkliche praktische Bedeutung erhalten haben, nachdem durch HANSEN's Reform die garantiert reine Hefe in den Gärungsraum eingeführt worden ist.

Pilzsporen, Hefenzellen und Bakterien zu töten, geprüft. Aus praktischen Gründen suchte KOCH jedoch zugleich darüber Aufklärung, in welchem Grade das zu untersuchende Mittel genüge, um die Entwickelung der Mikroorganismen in geeigneten Nährflüssigkeiten zu hemmen. Ich gebe hier in aller Kürze die aus der genannten Untersuchung KOCHs erhaltenen Resultate: die Karbolsäure zeigte sich nicht als ein so vorzügliches Desinfektionsmittel, wie man es im allgemeinen dafür hält. Eine 5prozentige Lösung vernichtete erst nach 48 Stunden die Entwickelungsfähigkeit der Milzbrandsporen, während die Milzbrandbacillen nach einer Einwirkung von 2 Minuten in einer 1prozentigen Lösung getötet wurden. Zur Hemmung des Wachstums der letzteren genügte eine Lösung von $^1/_{850}$; eine fünf- bis siebenmalige Befeuchtung von Milzbrandsporen mit einer 5prozentigen Lösung vermochte eine Verzögerung ihrer Entwickelung herbeizuführen. In öliger und alkoholischer 5procentiger Lösung war die Karbolsäure den Milzbrandzellen und -Sporen gegenüber absolut wirkungslos. In Dampfform wirkte die Korbolsäure kräftiger, doch konnte selbst eine zweistündige Einwirkung von Karbolsäuredämpfen von 75° C. die Entwickelungsfähigkeit der genannten Sporen nicht unterdrücken. Die schweflige Säure ist, selbst unter sehr günstigen Verhältnissen, nicht imstande alle Keime zu vernichten. Dagegen sind Chlor, Brom und Sublimat sicher wirkende Desinfektionsmittel. Das Sublimat wirkt nach KOCH in einem Verhältnisse von 1 : 1000, in den allermeisten Fällen schon in 1 : 5000 tötend auf alle Keime. Nach Untersuchungen von JOHAN-OLSEN werden jedoch Schimmelpilze nur durch mehr konzentrierte Lösungen unterdrückt, z. B. Penicillium erst von 1 : 400. Auch mehrere Bakterien (Puerperal — Abscess — Fäulnispilze) keimen und wachsen, obgleich langsamer als normal, auf Kartoffelscheiben, wenn diese mit einer Sublimatlösung von 1 : 500 durchgetränkt sind; erst eine Konzentration von 1 : 300 wirkt hemmend auf die Entwickelung ein. Im ganzen stellt er das folgende Resultat seiner Untersuchungen auf: Eine Konzentration von 1 : 1000 vermag nur bedingungsweise die Entwickelung einzustellen, nämlich bei wenigstens einstündiger Einwirkung und bei Entziehung von Nahrung, während sie bei kürzerer Einwirkungsdauer und bei Anwesenheit von Nahrung

für die Pilze nicht zuverlässig ist. In den physiologischen Laboratorien findet dieser Stoff fast überall Verwendung, in der Praxis auf Grund seiner starken Giftigkeit weniger. Für die Reinigung von Rohrleitungen, Kühlschiffen u. s. w., wo oft ganz bedeutende Ablagerungen von organischen Stoffen zu finden sind, die leicht durch die Wirksamkeit von Mikroorganismen in Zersetzung übergehen, sind namentlich Sodalösungen zu empfehlen; sie wirken lösend und lockernd auf die Harze und Eiweissstoffe, welche danach leicht durch Wasser entfernt werden können. Nach Versuchen von AUBRY und anderen hat sich der Chlorkalk, auch in starker Verdünnung (2—5prozentigen aktiven Chlor), als ein sehr vorzügliches Desinfektionsmittel bewährt, wegen seiner hohen pilztötenden Kraft. Dieser billige Stoff eignet sich daher besonders für die Reinigung von Wänden, Pflastern, Rinnsteinen u. s. w. Sehr energisch wirkt auch der doppelschwefligsaure Kalk (in Lösungen, welche 2—4 pCt. schwefliger Säure enthalten). Die Tropfsäcke, welche nach WILLS' Untersuchungen oft sehr starke Ansammlungen von wilden Hefen und Bakterien im Gewebe des Stoffes einschliessen, und welche in vielen Brauereien nur ungenügend gereinigt werden, müssen durch Behandlung mit einer etwa 5prozentigen Chlorkalklösung desinfiziert werden, man wäscht sie danach mit reinem Wasser ab. In solchen physiologischen Laboratorien, wo es speciell gilt, sich gegen Invasion von fremden Keimen zu schützen, wird auch eine spirituöse Lösung von Salicylsäure gute Anwendung finden können (wird von HANSEN im Carlsberger Laboratorium oft zur Reinigung der Tische benutzt). Die gärungshemmenden Wirkungen dieses Stoffes auch in verdünntem Zustande sind allgemein bekannt.

---

Wir kehren wieder zu unserem Ausgangspunkte zurück und geben hier einige Mitteilungen über die Einrichtung der Gefässe, in welchen die Kulturen im Laboratorium vorgenommen werden, und über die Wahl der Nährsubstrate.

An die Gefässe, in welchen die Kulturen vorgenommen werden, ist die Forderung zu stellen, dass sie jede Infektion von aussen ausschliessen. Diese Forderung ist im höchsten Grade

von den sogenannten PASTEURschen Kolben erreicht[1]). Die Abbildung zeigt ein solches Kölbchen in wenig veränderter Form, wie sie in dem von HANSEN dirigierten Carlsberger physiologischen Laboratorium angewendet wird. Unter dem Kochen der Nährflüssigkeit finden die Dämpfe zuerst ihren Weg durch das weite gerade Rohr, welches mit einem Stückchen Kautschukschlauch endet; wenn dieses geschlossen wird, haben die Dämpfe nur einen Ausweg, durch den gebogenen Tubus. Nach Verlauf einiger Zeit nimmt man das Kölbchen vom Sandbade und der gebogene Tubus wird mit einem Asbestpfropfen geschlossen. Hiermit ist die Sterilisierung fertig und der Inhalt des Kolbens wird jetzt Jahre hindurch stehen können, ohne sich zu ändern. Während der Abkühlung — des Saugens — wird die Luft teilweise durch den Asbesttampon filtriert; die weiter geführten Keime lagern sich im untersten Teile der Krümmung oder erreichen höchstens die Erweiterung des dünnen Rohres und kommen also mit der Flüssigkeit selbst nicht in Berührung. Hiermit ist gegeben, was gethan werden soll, wenn man die Flüssigkeit im Kolben in starke Bewegung setzen oder sie durch das gerade Rohr abfüllen will, indem man sie doch gleichzeitig keimfrei bewahren will: Der untere Teil des gebogenen Rohres muss geglüht werden. Soll der Kolben geöffnet und mit einem anderen Kolben in Verbindung gesetzt werden, muss dies entweder in einem kleinen, keimfreien Raume, oder Öffnen und Zusammenfügung muss in einer Flamme geschehen. Man stellt den BUNSENschen Brenner gerade vor sich, den zu entleerenden Kolben links und den



Fig. 3.
PASTEURsches Kölbchen.

1) Schon früher wurde zwar von HOFFMANN gefunden, dass, wenn man zur Sterilisation von Flüssigkeiten solche Gefässe benutzt, die mit offenen aber gebogenen Röhren versehen sind, so erhalten sich die Flüssigkeiten fortwährend steril. Obzwar er wohl also der erste ist, der das Prinzip für diese Kolben angegeben hat, werden wir doch aus praktischen Gründen den Namen nun nicht ändern, ist es ja doch auch durch PASTEUR, dass sie die grosse Anwendung bekamen.

Kolben, welcher die Flüssigkeit oder die Kultur empfangen soll, rechts bei dem Brenner. Nun wird das Rohr des linken Kolbens in der Flamme geöffnet, indem man hier schnell die Schlange mit darin sitzendem Glasstöpsel abzieht; während das offene Rohr sich in der Flamme befindet, wird der Glasstöpsel des zur rechten Seite stehenden Kolbens rasch abgezogen und das heisse Rohr des ersten Kolbens wird in die Schlange des zweiten Kolbens eingeführt. Man giesst nun die Flüssigkeit in diesen letzten Kolben hinein, indem das gebogene Rohr des ersten Kolbens geglüht wird. Danach wird wieder das Seitenrohr des linken Kolbens in die Flamme geführt, indem man gleichzeitig den flambierten Stöpsel des rechten Kolbens auf seinen Platz bringt, und endlich wird der linke Kolben mit seiner Schlange und daran sitzendem Stöpsel in der Flamme geschlossen. Wenn man schnell arbeitet, dann wird vor einer Infektion selten Gefahr sein.



Fig. 4.
CHAMBELANDscher Kolben.

In den letzten Jahren wurden verschiedene andere Kolben und Gefässe in Anwendung gebracht, namentlich der CHAMBERLANDsche Kolben (Fig. 4), dessen Hals mit einer eingeschliffenen Kappe gedeckt wird, welche oben in ein kurzes offenes Rohr ausgezogen ist; dieses Rohr ist mit dicht gestopfter sterilisierter Baumwolle gefüllt. Der PASTEURsche Kolben wird in gewissen Richtungen unentbehrlich sein, z. B. bei physiologischen Untersuchungen, wo man mit grösseren Mengen von Flüssigkeiten arbeitet.

Was die Nährsubstrate betrifft, ist es selbstverständlich immer die Aufgabe, solche zu finden, welche sich am besten für den betreffenden Organismus eignen. Besitzen sie gleichzeitig den Vorzug, dass sie an und für sich für die Entwickelung konkurrierender Formen weniger günstig sind, dann ist viel gewonnen. Es gilt natürlich als Regel, wo vergleichende Untersuchungen in anderen Richtungen angestellt werden, dass die Nährflüssigkeit immer die gleiche bleiben muss. Zur Untersuchung der Alkoholgärungspilze verwendet HANSEN am häufigsten die gehopfte Würze von den Tropfsäcken; in speciellen Fällen wird bei Untersuchungen dieser Art Hefenwasser mit einem Zusatze von Glycose oder

einer Lösung von Saccharose oder anderen Zuckerarten in Wasser benutzt. Will man einen festen Nährboden verwenden, kann man die Flüssigkeit mit 5—10 pCt. Gelatine vermischen. Zu Bakterienuntersuchungen verwendet man ähnliche Flüssigkeiten oder häufiger Fleischextrakt mit einem Zusatze von Pepton; diese Mischung wird z. B. mit kohlensaurem Natron neutralisiert. Als gelatinierende Mittel wendet man entweder Gelatine oder Agar-Agar an. Zum Studium der Schimmelpilze sind feste Nährsubstrate, speciell für die meisten Fälle sterilisiertes Schwarzbrot, das beste. Will man Flüssigkeiten benutzen, dann eignet sich hierzu die Bierwürze, Fruchtdekokte oder Zuckermischungen mit einem Zusatze von Weinsäure oder weinsauren Salzen. PASTEUR benutzte bei seinen Untersuchungen über die Gärungsorganismen (Ét. sur le vin 1866 und 1873, Ét. sur le vinaigre 1868, Ét. sur la bière 1876) ausschliesslich Flüssigkeiten als Substrate. Später wurden die festen Substrate sehr ausgedehnt benutzt, und hier hat namentlich KOCH viele praktische Erläuterungen gegeben.

Wir haben so kürzlich auseinandergesetzt, wie unsere Mikroorganismen kultiviert werden, geschützt gegen Infektion von der Flüssigkeit selbst, von den Gefässen und Geräten, von der Luft und dem Arbeitenden. Wir stehen dann der ersten und wichtigsten Frage gegenüber: Wie erreicht man die erste absolute Reinkultur, welche in den Kolben hineingeführt wird? Wie oben angegeben, begann ich aus rein historischen Gründen damit, die Bedingungen für die Bewahrung der Reinkultur anzugeben, weil man diese kannte, lange bevor man erreicht hatte, die Reinkultur selbst mit Sicherheit darzustellen[1]).

Es wird hier lehrreich sein zu sehen, wie man Schritt für Schritt vorwärts gegangen ist, und wir greifen darum wieder die Sache historisch an von dem Augenblicke, wo wirklich rationelle Bestrebungen zur Erreichung des Zieles vorliegen.

In seinen Studien über das Bier (1876) gab PASTEUR zwei ausführliche Kapitel über die Kultur von Mikroorganismen in reinem Zustande; im vierten Kapitel erwähnt er die

1) Die Prinzipien für die ganze Sterilisationstechnik waren schon in den alten Versuchen über die Urzeugung (generatio aequivoca) von SPALLANZANI (1765, 1776) und seinen Nachfolgern, namentlich von SCHULZE, SCHWANN (1836), SCHRÖDER und DUSCH (1854) gegeben.

Schimmelformen und die Organismen, welche eine Kahmhaut auf zuckerhaltigen Flüssigkeiten bilden, im fünften Kapitel die Hefenformen. Wir wählen einige Beispiele aus diesen Kapiteln. Um eine reine Vegetation der allgemeinen Pinselschimmel (Penicillium glaucum) zu erhalten, giebt PASTEUR den folgenden Vorgang an: Man lässt auf einem passenden Material den Pilz sich entwickeln, was mit keiner Schwierigkeit verbunden, da er in der Natur allgemein verbreitet ist, und wenn er seine fruchttragenden Hyphen vom Substrate gehoben und eine reichliche Menge von Conidien, die sich dem blossen Auge als ein feiner Staub zeigen, entwickelt hat, führt man ein Stückchen Platindraht, welches unmittelbar vorher durch eine Flamme gezogen wurde, über die Vegetation hin, so dass man den feinen Staub berührt, und danach schnell in einen der beschriebenen Kolben hinein. In diesem soll sich dann eine reine Vegetation des Pilzes entwickeln. Der Verfasser hebt jedoch selbst hervor, dass eine grosse Gefahr für die Reinheit darin liegt, dass die Luft zur ersten Kultur fremde Zellen geführt haben kann, welche man gleichzeitig auffängt und aussät. Er geht daher weiter und giebt einen anderen, zuverlässigeren Vorgang an. Man nimmt eine Anzahl von den allgemeinen Kolben mit einem einzelnen geraden Halse, welcher in eine feine Spitze ausgezogen ist (Vakuumskolben, Fig. 5); sie werden zur Hälfte mit einer passenden Nährflüssigkeit gefüllt und sterilisiert. Während des Kochens schmilzt man die obere Spitze des Halses zu, und beim Abkühlen dringt dann keine Luft in den Kolben. Eine Anzahl Kolben, in dieser Weise präpariert, werden an einem passenden Orte angebracht, die äusserste Spitze des Halses wird mit einer in der Flamme ge-

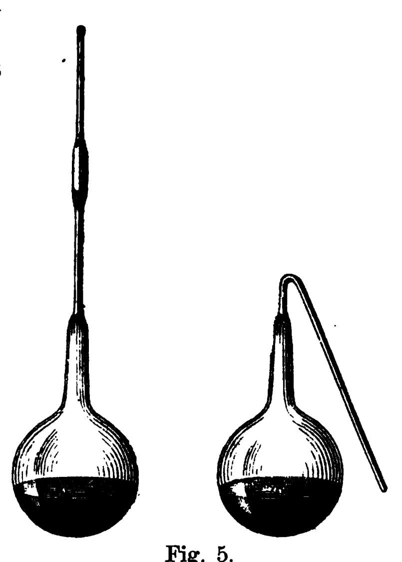


Fig. 5.
Vakuumskolben.

reinigten Zange abgebrochen und die Luft mit ihren lebendigen Keimen dringt nun mit Heftigkeit in den Kolben hinein, wonach die Spitze wieder zugeschmolzen wird. „Es kommt dann oft vor, dass sich Penicillium allein zeigt, so zahlreich sind die in der Luft schwebenden Conidien dieses Schimmelpilzes. Wir haben deutlich genug unter diesen Bedingungen ein Feld von Conidien ohne die geringste fremde Beimischung.“ Von einem solchen Kolben werden dann mit dem Platindrahte einige Conidien in einen anderen Kolben hineingeführt: „hierin haben wir das sicherste Mittel dazu, die Conidien von Penicillium vor Verunreinigungen befreit zu kultivieren.“ Genauer besehen stellt sich die Sache nicht wesentlich besser im letzteren als im ersten Falle; denn wie die Luft im ersten Falle alles Mögliche mit sich zu dem Schimmelrasen, welcher mit dem Platindrahte berührt wird, führen konnte, so gilt ganz dasselbe im zweiten Falle, nur nach einer kleineren Skala.

Einen ähnlichen Vorgang erwähnt PASTEUR im 5. Kapitel zur Reindarstellung der Alkoholgärungspilze (Seite 193): Eine kleine Portion Hefe wird getrocknet und mit Gipspulver zerrieben. Dieser feine Staub wird von einem möglichst hohen Standpunkte in die Luft hinausgeworfen, und während die Partikeln herabfallen, werden wie im vorigen Falle eine Reihe von Kolben geöffnet, und es mögen dann durch Zufall Hefezellen, welche in der so gebildeten Staubwolke fein verteilt sind, in einige der Kolben vereinzelt eindringen. — Es ist dann, wie bei dem Schimmelpilz, der Zufall, welcher eine Reinkultur hervorbringt. Da es zur Zeit, wo PASTEURs Werk erschien, noch keine Merkmale zur Bestimmung der Arten gab, war der angegebene Weg um so mehr unsicher.

Die obengenannten zwei Beispiele bieten ein sehr grosses Interesse, indem wir in den Versuchen des berühmten französischen Naturforschers vielleicht den ersten Keim zu der sogenannten fraktionierten Kultur sehen. Der Gedanke, welcher in diesen Versuchen liegt, ist der, dass mittels irgend eines Stoffes — im obengenannten Falle der Luft — eine so feine Verteilung der mikroskopischen Keime hervorgebracht wird, dass man dadurch in den Stand gesetzt wird, dieselben vereinzelt auszusäen. Diese

Methode wurde im letzten Dezennium weiter entwickelt und wir werden sie in ihren verschiedenen Stufen darstellen.

Bevor wir hierzu übergehen, werden wir kurz zwei andere Richtungen nennen, welche dasselbe Ziel anstreben und noch häufig als vorbereitende Hilfsmittel Anwendung finden. Es ist einerseits die Möglichkeit gegeben, dass verschiedenartige Organismen gleichen feindlichen Eingriffen in ihre Lebenswirksamkeit verschiedenen Widerstand gegenüberstellen können, und andererseits können die verschiedenen Arten sich etwas verschieden verhalten, wenn ihnen dieselbe Nahrung geboten wird. Diese zwei Erfahrungen hat PASTEUR vorzugsweise benutzt, um sich Reinkulturen zu verschaffen. Eine allgemein verwendete Methode zur Darstellung einer Reinkultur des sehr verbreiteten Heubacillus (COHN) ist diese, dass ein Heu-Infusum einige Tage stehen bleibt, wonach es kurze Zeit gekocht und dann wieder zur weiteren Entwickelung der Sporen hingestellt wird. Da die Sporen von Bacillus subtilis nämlich einem Wärmegrad von 100° C. widerstehen, während andere vegetative Bakterien unter diesen Umständen getötet werden, so können die überlebenden Sporen des Heubacillus sich entwickeln und eine Reinkultur geben — sofern sich im Infusum keine anderen ebenso widerstandsfähigen Sporen als diese befinden.

Wenn in einer Mischung von Mikroorganismen eine Art sich befindet, welche von der Nahrung, die der Mischung geboten ist, besonders angesprochen wird, so wird, indem man stets eine Spur der succesive entwickelten Vegetationen in neue Kolben mit derselben Nahrung hineinführt, immer die betreffende Art auf Kosten der übrigen sich entwickeln, und so der Zeitpunkt eintreffen, wo diese Art das ganze Territorium erobert zu haben scheint. Wir müssen jedoch hier wieder die Möglichkeit bedenken, dass die übrigen Keime möglicherweise nur in der Entwickelung gehemmt oder stark zurückgedrängt sind; die begünstigte Art nützt die Nahrung mehr und mehr aus und tritt früher oder später in einen Abschwächungszustand ein, vielleicht gehemmt und vergiftet von den Stoffen, welche sie während ihrer Ernährungswirksamkeit selbst hervorgebracht hat — und wo ist jetzt die Sicherheit dafür, dass nicht dann die anderen Arten günstigere Chancen für ihre Entwickelung finden? Eine Thatsache dieser

Art kennt man mit Gewissheit in der praktischen Gärungsindustrie. Auch kann hier der Fall eintreffen, dass zwei oder mehrere Arten unter den angegebenen Verhältnissen gleich vermehrungsfähig sein können.

Nach dieser Abschweifung, welche nicht nur ein Glied in der Geschichte der Fortschritte, sondern auch in der der Irrtümer war, kehren wir zu den sogenannten fraktionierten Kulturen — Verdünnungsmethoden — zurück. Hier haben NÄGELI für die Bakterien und HANSEN für die Hefen interessante Beiträge gegeben. Um eine Aussaat von einem Individuum zu bewerkstelligen, ist es zuerst notwendig zu wissen, wie viele Individuen sich in einem bestimmten Volumen der Nährflüssigkeit befinden. Dies berechnete NÄGELI (1882) und suchte danach seinen Versuch in der Art einzurichten, dass die Flüssigkeit, bis zu einem gewissen Grade verdünnt, in einem gegebenen kleinen Volumen einen Keim enthalten sollte.

Eine Aussaat dieses Volumens wäre folglich die Grundlage einer wirklichen Reinkultur[1]). Man ist hier dem Ziele etwas näher gerückt, und insofern die angestellte Berechnung richtig ist, und das Experiment sorgfältig ausgeführt wird, kann auf diesem Wege das Gewünschte erreicht werden. Es ist einleuchtend, dass die Bedingungen immer einigen Zweifel hinterlassen mögen, denn eine genaue Zahlenangabe der Individuen einer Bakterienvegetation ist mit den bis jetzt bekannten Hilfsmitteln unmöglich. Selbst wenn dies möglich, stellte sich doch eine neue Frage auf: Wie unterscheidet man die Kolben, welche eine Zelle empfangen haben, von den Kolben, welche, trotz der Berechnung, mit mehreren Zellen infiziert wurden? Für die Bakterien wurde kein Mittel dazu gefunden.

Die erste von HANSEN angegebene Methode zur Darstellung absoluter Reinkulturen von Hefe (1882) ging von einer Ver-

1) Ein Beispiel: Ein Tropfen einer verfaulten Flüssigkeit, welcher 0,03 *ccm* mass, enthielt nach der Berechnung 500 000 Individuen; der Tropfen wurde mit 30 *ccm* sterilem Wasser versetzt und war so 1000 Male verdünnt; von der stark geschüttelten Flüssigkeit wurde ein Tropfen herausgenommen und mit 30 *ccm* Wasser versetzt; die ursprüngliche Flüssigkeit war so 1 000 000 Male verdünnt, und jeder zweite Tropfen würde also einen Keim enthalten.

dünnung mit Wasser aus: Die im PASTEURschen Kolben entwickelte Hefe wird in einem willkürlich gewählten Verhältnisse mit sterilisiertem Wasser verdünnt, und man zählt die Anzahl von Zellen in einem kleinen Tropfen der stark geschüttelten Flüssigkeit. Die Zählung wird in diesem Falle ganz einfach in der Weise ausgeführt, dass der herausgegriffene Tropfen auf ein mikroskopisches Deckgläschen übergeführt wird; mitten auf diesem Deckgläschen sind einige kleine Quadrate eingeritzt, welche Anhaltspunkte für das Auge bieten können, und das Gläschen ist mit der feuchten Kammer (Fig. 2) verbunden; der Tropfen darf nicht über die Grenzen der Quadrate hinausfliessen; man zählt darauf die in dem kleinen Tropfen befindlichen Zellen. Es finden sich z. B. 10 Zellen, und man führt nun einen Tropfen ähnlicher Grösse von der wieder stark geschüttelten Flüssigkeit in einen Kolben mit einem bekannten Volumen, z. B. 20 *ccm* sterilisierten Wassers hinein. Es spricht dann eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür, dass dieses Kölbchen ca. 10 Zellen enthält. Wird nun dessen Inhalt stark und lange geschüttelt und danach 1 *ccm* der Flüssigkeit in je einen von 20 Kolben mit Nährflüssigkeit eingeführt, dann hat wahrscheinlich die Hälfte dieser 20 Kolben je eine Zelle empfangen. Das Ganze ist aber bisher nur wie bei NÄGELI eine Wahrscheinlichkeitsrechnung. Lässt man die Kolben zur weiteren Entwickelung stehen, dann hat man Aussicht, in einzelnen derselben eine Reinkultur zu erhalten. Hierauf kann jedoch nicht mit Sicherheit weiter gebaut werden. Es gelang aber HANSEN ein Glied hinzuzufügen, welches diesem Experimente erst Sicherheit giebt. Schüttelt man nämlich die eben infizierten Kolben sehr stark und stellt sie danach ruhig hin, so sinken die einzelnen Zellen zu Boden und lagern sich an der Wand des Kolbens. Es ist einleuchtend, dass, wenn der Kolben z. B. drei Zellen enthält, diese drei Zellen nach dem starken Umschütteln immer oder wenigstens in den allermeisten Fällen von einander entfernt und folglich jede für sich am Boden abgelagert werden. Nach einigen Tagen gewahrt man dann, wenn man den Kolben vorsichtig emporhebt, dass sich ein oder mehrere weisse Flecke auf der Wand des Glases gebildet haben. Findet sich nur ein solcher Fleck, so haben wir die Reinkultur.

Es ist einleuchtend, dass man mittels dieses Verfahrens auch

dazu imstande ist, direkt eine einzige Zelle in den betreffenden Kolben mit Nährlösung einzuführen.

Durch diese Methode stellte HANSEN alle seine ersten Reinkulturen dar, mit welchen er seine grundlegenden Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze ausführte.

Ein anderer Weg wurde von R. KOCH (1881) eingeschlagen, indem er seine Reinkultur durch Impfstriche in Nährgelatine darstellte. Später hat er eine weit bessere Methode, die sogenannte Plattenkultur (1883), ausgearbeitet. Als Verdünnungsflüssigkeit benutzt er zuerst sterilisiertes Wasser und danach eine Nährflüssigkeit, welcher so viel Gelatine zugesetzt ist, dass sie bei gewöhnlicher Temperatur erstarrt. Hierdurch wird erreicht, dass die Keime fest liegen und sich frei von einander entwickeln können. Der Vorgang ist: Von der unreinen Kultur wird eine Spur herausgenommen, welche in einer grossen Menge sterilisierten Wassers überführt wird. Hiervon wird wieder ein kleines Quantum in einen Kolben eingeführt, welcher z. B. eine Mischung von Bouillon und Gelatine, zu 30° C. erwärmt, enthält. Der Kolben wird geschüttelt, um die Keime zu verteilen, und der Inhalt wird dann auf eine grosse Glasscheibe, die von einer Glocke gedeckt ist, ausgegossen. Kurz danach erstarrt die Gelatine, und die Keime liegen jetzt in der festen Masse eingegossen. Sie entwickeln sich nach ein paar Tagen zu Kolonieen — Punkten oder Flecken, welche für das blosse Auge sichtbar sind. Die Reinheit der Vegetationen in der Gelatine wird für die Bakterien nach KOCH zum Teil durch ihr Aussehen, Farbe, Form u. s. w. bestimmt.

Genaue Untersuchungen, z. B. von HANSEN, HOLM und MIQUEL haben gezeigt, dass das KOCHsche Plattenverfahren jedoch mit grösseren Fehlern behaftet ist, als man sich dies gewöhnlich vorstellt; so fand MIQUEL, dass in 100 Kolonieen, nach dem Plattenverfahren dargestellt, 134 verschiedene Arten von Bakterien versteckt waren. Dies hängt offenbar damit zusammen, dass es sehr schwer, oft vollständig unmöglich ist, durch Schütteln der Gelatinemischung alle Bakterien- sowie auch andere Keime jeden für sich zu isolieren. Die Methode von KOCH bezeichnet jedoch einen bedeutenden Fortschritt, und für die Bakterien ist es in vielen Fällen kaum möglich, sich den Ausgangspunkt von der einzelnen Zelle zu garantieren.

Die von HOLM angestellten, noch nicht abgeschlossenen Versuche wurden mit Hefekulturen und Würzegelatine in feuchten Kammern ausgeführt. Die Zellen wurden unter dem Mikroskope gleich markiert und nach zweitägiger Kultur untersucht. In 13 Versuchen waren im günstigsten Falle 100 Kolonieen aus 103 Zellen, im ungünstigsten Falle aus 135 Zellen gebildet. In gleichzeitig angestellten Versuchen zeigte sich, dass wenn die Hefe beim Schlusse der Hauptgärung zur Kultur genommen wurde, so entwickelten sich 12,5 bis 43,3 pCt. der Zellen nicht; wurde sie dagegen beim Anfange der Hauptgärung genommen, so kamen nur 2,3 bis 10,4 pCt. nicht zur Entwickelung. (Nach mündlicher Mitteilung.)

Die Frage ist also: Wie können wir uns eine absolute Reinkultur von Hefe darstellen? HANSEN hat die Antwort gegeben: Dadurch, dass die Gelatineschicht, welche von der erstarrten Nährflüssigkeit gebildet wird, in einer solchen Weise angebracht wird, dass unter dem Mikroskope zu beobachten ist, wo die isolierten Keime liegen; dass man ferner die Lage dieser Keime sich genau merken oder auch unter dem Mikroskop schrittweise die Entwickelung des Individuums beobachtet. Die Glasplatte, welche in dem KOCHschen Versuche eine bedeutende Grösse hat, ist hier ein rundes Deckglas von ca. 30 *mm* Durchmesser. Dieses wird auf einem Glasringe befestigt, welcher wiederum auf einem dickeren Glase angebracht wird, also eine der früher erwähnten feuchten Kammern bildet (cfr. Fig. 2, S. 8), welche dem Zweck angepasst ist und eine feste Gelatineschicht an der inneren oberen Seite trägt. Der Schwerpunkt in HANSENs Methode liegt darin, dass er im Gegensatze zu KOCH von der Aussaat einer einzigen Zelle ausgeht. Die Keime sollen so stark verteilt werden, dass sich nur verhältnissmässig wenige in der Gelatineschicht finden; entweder lässt man dann die Kammer unterm Mikroskope stehen, um der Vermehrung der Keime direkt zu folgen, oder man merkt sich, durch Einteilung der Glasscheibe in kleine Quadrate oder durch den Objektmarkierer, wo die sicher isolierten Keime liegen und stellt den Apparat in den Vegetationskasten, bis die Kolonieen fertig gebildet sind. Man kann auf einem Deckglase 50—60 gut isolierte Keime haben. Wenn die Kolonieen entwickelt sind,

sollen sie mit einem Platindrahtstückchen, welches vorher geglüht wurde, in den PASTEURschen Kolben eingeführt werden. Die Kultur befindet sich bei dieser Übertragung einen Augenblick in der Luft und ist hier der Infektion ausgesetzt. Auf diesem einzigen schwachen Punkt wird aber das Spiel des Zufalls auf ein verschwindendes Minimum, auf Null, herabgebracht, wenn die genannte Operation in einem kleinen abgegrenzten, keimfreien Raume vor sich geht, z. B. in einem kleinen Kasten mit gläsernen Wänden, welcher gross genug ist, um die Apparate und die Hände des Arbeitenden zu fassen. Der Kasten ist mit einer Thür versehen, durch welche die Hände eingeführt werden können; die Wände sind inwendig feucht, die Hände des Experimentators von allen lebenden Keimen befreit. In dieser Weise geht die Überführung der Kolonie mit aller erdenklichen Sicherheit vor sich. Von dem ersten Kolben kann die Kultur ohne Infektion in immer mehr und grössere Kolben überführt werden, und nach allgemeiner Kritik behaupten wir dann, dass die HANSENsche Methode dem Ziele so nahe gerückt ist als möglich.

---

In der Hefen- und Spiritusfabrikation wird es von Bedeutung sein, die Vermehrungsfähigkeit der Hefenzellen während der Entwickelung der Hefe zu bestimmen. Dies muss selbstverständlich durch eine direkte Zählung der Zellen geschehen, die in einem bestimmten Volumen der gärenden Flüssigkeit in verschiedenen Stadien der Gärung sich befinden. Solche Versuche wurden namentlich von DELBRÜCK, HANSEN, DURST, HAYDUCK und PEDERSEN vorgenommen, eine Zählung der Bakterien wurde besonders von FITZ ausgeführt.

Die Zählung wird durch den von HAYEM und NACHET konstruierten Apparat bewerkstelligt (Fig. 6), welchen man zuerst zur Zählung der Blutkörper anwandte (darum Hämatimeter genannt). Es war der verstorbene Prof. PANUM in Kopenhagen, welcher diesen Apparat zum ersten Male zur Zählung der Mikroorganismen, um ihre Vermehrungsfähigkeit zu bestimmen, verwendete. Das Hämatimeter besteht, wie die Figur zeigt, aus einem Objektglase, worauf ein Deckglas von bekannter Dicke

(z. B. 0,2 *mm*) festgekittet ist, und in dessen Mitte eine runde Öffnung ausgeschnitten ist. In diese Vertiefung bringt man einen kleinen Tropfen der Flüssigkeit, welche die Zellen enthält; ein Deckglas wird über die Öffnung gelegt und ruht so auf dem festgekitteten durchlöcherten Deckglase. Der Flüssigkeitstropfen darf nicht so gross sein, dass er durch diesen Druck über den von dem Ausschnitt begrenzten Raum hinausfliesst, er muss aber hoch genug sein, um von dem aufgelegten Deckglase berührt zu werden. Man kennt somit die Dicke der Flüssigkeitsschicht. Um auch die zwei anderen Dimensionen zu bestimmen, und so mit einem gegebenen Volumen der Flüssigkeit zu operieren, bringt man im Okular des Mikroskops eins der allgemein bekannten Mikrometer, ein dünnes Glasstückchen, worin z. B. 16 kleine Quadrate eingeritzt sind, an. Den wirklichen Wert eines solchen Quadrates bei Anwendung eines gegebenen Systems kennt man, und so ist, indem das Quadrat auf das Objekt herab projiziert wird, ein kleines Prisma von bekanntem Volumen abgegrenzt. Mehr praktisch in gewissen Fällen ist, wie ZEISS-Jena nach Anweisung von THOMA gethan hat, ein feines System von Quadraten bekannter Grösse im Boden der Vertiefung an dem Objektglase selbst anzubringen; hierdurch wird zugleich die mikroskopische Einstellung auf die Zellen, welche sich am Boden der Kammer befinden, sicherer sein.

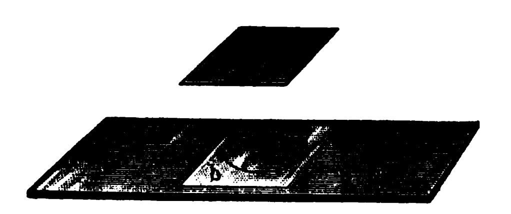



Fig. 6.
Hämatimeter.
*a* Objektträger, *b* festgenittetes Deckgläschen mit zirkelrunder Öffnung, *c* Deckgläschen.

Wenn es nur eine Bestimmung der Vermehrungshastigkeit der Zellen gilt, also wiederholte Angaben der Zahl von Zellen in demselben Volumen, dann ist es ja überflüssig, die Grösse dieses Volumens zu bestimmen; die Aufgabe ist dann nur, immer mit demselben Volumen zu arbeiten.

Es wird stets verlangt, dass die genommene Probe eine Durchschnittsprobe sein soll; diese muss in den meisten Fällen verdünnt werden, und wird längere Zeit stark durchgerührt, um

eine gleichmässige Verteilung der Zellen herbeizuführen; das specifische Gewicht der Flüssigkeit muss so sein, dass sie erlaubt, dass die Zellen kurze Zeit darin schweben bleiben. Mit einem Haarröhrchen wird ein Tropfen aufgesaugt, welcher in den Zählapparat überführt und vom Deckgläschen bedeckt wird. Man lässt nun den Apparat einige Zeit ruhig stehen, damit die Zellen sich im abgegrenzten Raume zu Boden setzen können, und darf das specifische Gewicht der Flüssigkeit darum auch nicht grösser sein, als dass dies in passender Zeit geschehen kann. Die beiden Forderungen werden gewöhnlich von der in den Brauereien benutzten Würze erfüllt.

Zeigt sich nun, dass in dem bestimmten Volumen sich zu viele Zellen befinden, um mit Sicherheit gezählt werden zu können, so muss die Flüssigkeit verdünnt werden. Es kann dies auch in anderer Beziehung zweckmässig sein, teils um die Schaumbildung, die sonst bei dem starken Umrühren häufig eintritt, zu verhindern, teils um die einzelnen Zellen zu isolieren, welche in der Würze häufig in Kolonieen oder grösseren Massen zusammengeballt sind und nicht immer bei der Umrührung gesondert werden, und endlich um zu bewirken, dass beim Anfange des Versuches ein Aufhören der Gärung und der Vermehrung der Hefenzellen stattfindet.

HANSEN fand, dass verdünnte Schwefelsäure (1 : 10) im ganzen diesen Forderungen entspricht; auch Chlorwasserstoffsäure, Ammoniak und Natronlauge lassen sich anwenden, aber weniger gut. Verlangt man eine sehr starke Verdünnung, dann kann man, nachdem 1—2 Volumen verdünnter Schwefelsäure zugesetzt wurden, destilliertes Wasser zufügen.

Wenn man die verschiedenen Flüssigkeitsvolumina mit Genauigkeit abmisst und namentlich durch starkes und andauerndes Umrühren für eine wirkliche Verteilung der Zellen sorgt, dann kann mit grosser Genauigkeit gearbeitet werden. Es müssen immer 2 gleiche Verdünnungen hergestellt und Proben von beiden zur Zählung herausgenommen werden. Ebenso muss man natürlicherweise auch bei Versuchen bestimmen, wie viele kleine Quadrate zur Zählung ihres Zellinhalts benutzt werden müssen, um eine richtige Mittelzahl zu erreichen. Man setzt dann eine solche Zählung und Bestimmung der Durchschnittszahlen fort, bis eine neu gefundene Grösse ohne Einfluss auf den Durchschnittswert

sich ergiebt. Die Anzahl der Zählungen und überhaupt die Genauigkeit beruht auf der Übung und der Sorgfalt, die man anwendet. HANSEN fand, dass es gewöhnlich genügte, die Zellen in 48 oder 64 kleinen Quadraten zu zählen.

---

# 2. Kapitel.

## Luft- und Wasseruntersuchungen.

Wie das Wasser bisher im Gärungsbetriebe als einer der rätselhaften Faktoren dastand, welcher häufig für Unregelmässigkeiten, die in keiner andern Weise erklärt werden konnten, die Schuld tragen musste, so wurden zu allen Zeiten viele Eigentümlichkeiten der an einem bestimmten Orte erreichten Resultate als von der Luft herrührend betrachtet. Es lag hierin eine dunkle Ahnung, dass diese unsichtbare Luft doch Stoffe enthalte, welche in unsere Wirksamkeit nachteilig eingreifen — welcher Art diese Stoffe seien und wie man überhaupt eine nähere Kenntnis derselben erhalten könne, darüber befand man sich bis zur neuesten Zeit gänzlich im Unklaren. Chemische Untersuchungen der Luft sind schon über 100 Jahre alt. Im Jahre 1774 fand PRIESTLEY und SCHEELE, dass die Atmosphäre aus Sauerstoff und Stickstoff bestand. 1804 wiesen GAY LUSSAC und HUMBOLDT nach, dass die Proportion zwischen diesen zwei Stoffen überall genau die gleiche ist; später wurde gefunden, dass die Luft ferner Wasserdämpfe, Kohlensäure, Ammoniak und Salpetersäure, und an einzelnen Orten wechselnde Mengen von Chlor, Schwefelwasserstoff u. s. w. enthalte.

Nach und nach kam noch ein neuer Faktor hinzu: es wurde unzweifelhaft dargethan, dass die Luft nicht überall der menschlichen Natur gleich zuträglich ist; es dürfte sich möglicherweise etwas finden, was unsern Organismus angreift; dieses Unbekannte wurde die „Miasmen“ (Mischungen) genannt; das Wort wurde

rein chemisch aufgefasst. Da diese Mischungsverhältnisse jedoch nicht genauer nachgewiesen wurden, war die Wissenschaft damit keinen Schritt weiter gerückt.

Für ganz einzelne Forscher tauchte eine neue Seite des Inhalts der Luft auf: die Mikroorganismen, und binnen kurzer Zeit wurde klargelegt, dass solche sich in der Luft überall finden; damit war auch wahrscheinlich gemacht. dass diese eine bedeutende Rolle unter den Konstituenten der Luft spielten. Dass diese Mikroorganismen auch für die Gärungsindustrie von wesentlicher Bedeutung sind, wurde namentlich von PASTEUR dargethan, indem er nachwies, dass die Luft sowohl Bakterien als Alkoholhefenpilze enthalte.

Hiermit sind die Aufgaben gegeben: Welcher Art sind diese in der Luft schwebenden Keime? In welchem Grade, in welchem Umfange kommen sie im Raume vor? Ist ihre Anzahl und Art zu den einzelnen Jahreszeiten verschieden? Und endlich: Sind sie wirklich im stande, in nachdrücklicher Weise in den Betrieb eingreifen zu können?

Es wird von Interesse sein, einen Blick auf die verschiedenen Methoden zu werfen, durch welche man die Luft mit Hinsicht auf ihre Keime zu analysieren gesucht hat.

Die meisten Luftanalysen hatten zum Ziel etwas Licht in die räthselafte Finsternis zu schaffen, welche die meisten kontagiösen Krankheiten einhüllt, die ja bekanntlich fast alle auf die Wirksamkeit mikroskopischer Organismen zurückgeführt werden. Für die Fermentorganismen liegen Untersuchungen von PASTEUR und später besonders von HANSEN vor. Der französische Naturforscher gab an, dass diese Keime zwar immer in der Luft herumschweben; in der Regel findet man sie jedoch in weit grösserer Menge in dem Staube der zu benutzenden Geräte abgelagert. Die eigentlichen Alkoholgärungspilze sind in verhältnismässig geringer Zahl in der Luft vorhanden, während die Keime der Schimmelpilze häufiger sind; er wies ferner, sowie später TYNDALL, nach, dass der Inhalt der Luft an Keimen wechselt, was sowohl die Menge wie die Arten betrifft. Diese Resultate wurden in der Weise eingeholt, dass PASTEUR in offenen flachen Schalen an verschiedenen Orten Bierwürze, Weinmost oder zuckerhaltiges Hefenwasser hinstellte; nach einiger Zeit

wurde dann ihr Inhalt auf mikroskopische Keime untersucht. Ferner benutzte PASTEUR hierzu die früher (S. 17) beschriebenen Vakuumskolben.

Der Naturforscher, welcher in den letzten Jahren ohne Zweifel die bedeutungsvollsten Luftanalysen vorgenommen hat, ist MIQUEL, Vorstand des auf Montsouris bei Paris speciell zu diesem Zwecke eingerichteten Laboratoriums. Auch sein Mitarbeiter FREUDENREICH hat in dieser Beziehung sehr wertvolle Beiträge gegeben.

MIQUEL führte seine ersten Untersuchungen mit einem sogenannten Aëroskope (Fig. 7) aus, welches in folgender Weise hergestellt ist: Von dem Scheitel einer Glocke A geht ein Rohr C aus, wodurch Luft gesaugt wird, sodass sie die Glocke passiert. In der Glocke ist ein hohler Kegel eingeschraubt, welcher seine Mündung B nach unten wendet; in der Spitze dieses Kegels D befindet sich eine feine Öffnung, durch welche die eingesaugte Luft hinausfährt, und gerade über diese Öffnung ist eine dünne Glasscheibe mit einer Mischung von Glycerin und Glykose bedeckt, angebracht. Was die Luft mit sich führt, wird wenigstens teilweise auf der dickflüssigen Mischung abgesetzt. Die hier aufgefangenen Mikroorganismen werden auf der Glasscheibe möglichst gleichmässig verteilt und unter dem Mikroskope gezählt. Diese Methode ist in sofern mangelhaft, als man keinen Aufschluss über den wichtigsten Punkt, welche und wie viele der eingefangenen Keime wirklich entwickelungsfähig sind, erhält. Um dies zu erfahren, benutzte MIQUEL andere Methoden. Er fängt die Luftkeime in sterilisiertem Wasser auf. Mit einem gewissen kleinen Volumen der stark geschüttelten verdünnten Flüssigkeit werden nun eine grosse Reihe von kleinen Kolben mit Nährflüssigkeit (z. B. Fleischinfusum zur neutralen oder schwach alkalischen Reaktion gebracht) infiziert. Es gilt hier, durch Vorversuche die Verdünnung der von der Luft infizierten Flüssigkeit



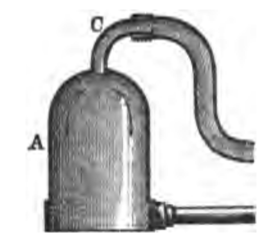




Fig. 7.
Aëroskop.

so weit zu führen, dass nach darauf folgender Infektion der kleinen Kolben eine grössere Zahl (z. B. die Hälfte) derselben sich steril zeigt; man hat dann eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür, dass in jedem der übrigen Kolben, in denen Vegetationen sich entwickelten, nur ein Keim ausgesät worden ist. Durch eine einfache Rechnung kann dann natürlich bestimmt werden, wieviele in dem benutzten Medium entwickelungsfähige Keime sich in einem bestimmten, in den ursprünglichen Kolben eingesaugten Volumen Luft fanden.

Durch diese Untersuchungsmethoden fand MIQUEL, dass gleich grosse Volumina Luft an demselben Orte zu verschiedenen Zeiten eine verschiedene Zahl von Bakterien enthalten. Ein andauernder Regen reinigt in hohem Grade die Luft von Bakterien und verringert sich ihre Zahl fortwährend, so lange die Erde feucht ist, wonach sie mit dem Austrocknen der Erde wiederum allmählich zunimmt. In den trockenen Jahreszeiten ist denn die Zahl der Bakterien in der Regel am grössten, während die Schimmelformen, welche in der Feuchtigkeit am besten gedeihen und deren Vermehrungsorgane frei in der Luft emporragen, gerade in diesen Feuchtigkeitsperioden in der Luft am häufigsten sind. Die reinste Luft findet man in der Winterzeit; die Luft in den Städten ist weniger rein als die ausserhalb der Städte; keimfreie oder beinahe keimfreie Luft findet sich am Meere und auf hohen Bergen. An gewissen Orten, z. B. in Hospitälern, zeigte sich die Luft sehr reich an Bakterien, so in einem Falle 50mal reicher als die Luft im Garten bei Montsouris.

Um die Luftkeime in Flüssigkeiten einzuführen, wurde von MIFLET in COHNs Laboratorium eine Wasserluftpumpe (Aspirator) benutzt, welche die Luft durch mehrere Kolben mit Nährflüssigkeit hindurchsaugte; diese Kolben wurden dann in einen Brutkasten zur Entwickelung gestellt und danach mikroskopisch untersucht. Das Prinzip für die Wasserluftpumpe ist z. B., dass die Kolben luftdicht mit dem oberen Teile eines sehr grossen Behälters in Verbindung gesetzt werden, welcher, mit Wasser gefüllt, unten einen Abflusshahn besitzt. Je nachdem Wasser hinausfliesst, wird also Luft hineinströmen, und diese muss folglich zuerst die Nährflüssigkeit passieren. Durch diese Untersuchungen wurde im allgemeinen konstatiert, dass die Luft zahlreiche entwickelungs-

fähige Bakterien besitzt. — Der wesentlichste Mangel dieser Apparate, welche Luft durch eine Flüssigkeit führen, ist, dass in dieser Weise nur ein Teil der Luftkeime eingefangen wird. Wenn die Luft durch die Flüssigkeit hinaufsteigt, wird ein Teil der Keime mitgerissen und weiter geführt. Diese von MIQUEL gemachte Beobachtung hat praktische Bedeutung, indem sie lehrt, dass eine Filtration der Luft durch Flüssigkeitsschichten, z. B. Schwefelsäure, nicht unter allen Verhältnissen hinlänglich ist. Dieses beruht sowohl auf der Schnelligkeit des Luftstromes als auf der Dicke und Beschaffenheit der Flüssigkeitsschicht. Den genannten Fehler hat MIQUEL dadurch ausgeglichen, dass er in seinem Kolben ein Asbestfilter anbringt.

Eine ganz andere Methode zur Untersuchung der Luftorganismen ist die in KOCHs Laboratorium eingeführte und von HESSE genauer entwickelte. Ein Glasrohr von circa 1 *m* Länge und 4—5 *cm* Weite wird am einen Ende mit einer durchlöcherten Kautschukmembran überzogen, über welche wieder eine neue nicht durchbohrte gebunden wird; es wird nun ein wenig flüssige Gelatinemischung in das Rohr gegossen, wonach das andere Ende des Rohres mit einem Kautschukpfropfen geschlossen wird, der in einer Durchbohrung ein mit einem Wattepfropfen verschlossenes Glasrohr trägt. Der ganze Apparat wird so stark erhitzt, dass er steril ist, wonach das Rohr horizontal angebracht wird, sodass die Gelatine zu einer Schichte in dem niederen Teile des Rohres erstarrt. Wenn die Luft untersucht werden soll, entfernt man die äussere Kautschukkappe; die Luft wird langsam durch das Rohr gesaugt, indem das andere Ende mit einem Aspirator verbunden wird. Die Keime der Luft senken sich dann auf die Gelatine herab, und nach beendigter Aspiration wird das Rohr wieder geschlossen und in den Thermostaten gebracht, wo die Keime dann sichtbare und also zählbare Kolonieen hervorbringen. Es zeigt sich bei hinlänglich langsamem Luftstrome, dass die Bakterien sich im vorderen Teile der Röhre entwickeln, während die Pilzsporen viel weiter innen in der Röhre zur Entwickelung gelangen. — Trotzdem, dass diese Methode auch ihre Vorzüge hat, steht sie doch in gewissen Richtungen vor der früher genannten zurück; sie wird in der Regel in noch höherem zu kleineren Ziffern führen, denn es zeigte sich, dass die

feste Gelatinenahrung oft nicht so günstig für die Entwickelung der vielen in der Luft schwebenden, oft stark eingetrockneten Keime als flüssige Nahrung ist; viele der Keime werden dann nicht Kolonieen bilden können und werden folglich auch nicht mitgezählt.

HANSENs Untersuchungen der Luft fallen in den Zeitraum 1878 bis 1882. Sein wesentlichstes Ziel war, Aufklärungen für die Gärungsindustrie zu bringen. Wie bekánnt, basieren seine Untersuchungen über Saccharomyces apiculatus (1880) zum Teil auf Arbeiten dieser Art. Da die Frage den Organismen, welche im Brauereibetriebe vorkommen, galt, so war auch die Wahl einer Nährflüssigkeit geboten: die in der Brauerei verwendete gewöhnliche Würze. Die angewendeten Apparate waren entweder allgemeine Kochflaschen mit mehreren Schichten flambierten Filtrierpapieres überbunden, deren Inhalt eine bestimmte Zeit gekocht wurde, oder Kolben derselben Art wie die PASTEURschen Vakuumskolben (S. 17), deren Hals zu einer feinen Spitze ausgezogen war, und die während des Kochens mit Lack geschlossen wurden. Ein wenig unterhalb der Spitze wurde mit dem Glasmesser eine Furche in das Rohr geschnitten, damit die Spitze leicht abgebrochen werden konnte, wenn der Luft Zutritt gegeben werden sollte.

Wenn diese Kolben sich am Orte, wo die Luft untersucht wurde, vollgesogen hatten, wurden sie wieder mit Lack verschlossen und stark geschüttelt, um den Inhalt der eingedrungenen Luft mit der Flüssigkeit zu vermischen. Sie wurden dann auf kürzere oder längere Zeit — bis zu 6 Wochen — hingestellt und nun mikroskopisch untersucht.

Bei dieser Untersuchung fand HANSEN oft, dass die Würze klar und anscheinend unverändert erhalten war, obgleich doch eine Entwickelung stattgefunden hatte. Man kann sich daher hier nicht auf die Untersuchung mit dem blossen Auge verlassen. Von solchen Formen, die, wenn sie in schwacher Entwickelung zugegen sind, makroskopisch nicht bemerkt werden können, nennt er: Aspergillus, Mucor, Penicillium, Cladosporium, Bacterium aceti und Pasteurianum und endlich Mycoderma cerevisiae. Auch wenn diese Mikroorganismen kräftige Vegetationen gebildet haben, wird die genannte Nährflüssigkeit sich klar erhalten.

Ferner zeigte sich, dass man bei Anwendung dieser Kolben oft Reinkulturen erhielt, indem nur eine Species mit der Luft ins Kölbchen eingedrungen war. Es war sehr selten, dass drei oder vier Arten in demselben Kolben sich fanden. Dies rührt davon her, dass jeder Kolben nur ein geringes Volumen Luft empfängt, und sind die Vorteile hierbei einleuchtend: Man gelangt nur zur wirklichen Kenntnis dieser Keime, wenn sie sich entwickelt haben; in dem Falle, wo mehrere Keime in denselben Kolben eindringen, würde aller Wahrscheinlichkeit nach der stärkste Keim in seiner Entwickelung die andern hemmen, so dass sie bei einer späteren Untersuchung nicht bemerkt würden. Gleichzeitig verlangt aber dieser Vorteil das Öffnen einer grossen Zahl von Kolben, wodurch diese Untersuchung umfassend und kostspielig wird. Da die Kolben nur darüber Aufschluss geben, was im Augenblicke der Öffnung sich in der Luft befindet, so wurden die Kochflaschen als ein Supplement benutzt, indem sie längere Zeit, bis zu 48 Stunden, an demselben Orte stehen blieben.

Nach diesen einleitenden Bemerkungen geben wir eine kurze Darstellung der Resultate HANSENs.

Er bestätigt die von PASTEUR zuerst aufgestellten Sätze, dass die Luft an verschiedenen nahe liegenden Punkten zur selben Zeit eine verschiedene Zahl und verschiedene Arten von Organismen enthalten kann; auch für Orte, die in demselben Garten einander nahe lagen, fand er die Gültigkeit dieser Regel bestätigt. Als andere bezeichnende Charakterzüge für die Verbreitung der Organismen giebt HANSEN an, dass z. B. Organismen, welche in der ersten Hälfte vom Juli unter den Kirschbäumen im Garten allgemein vorkamen, in der letzten Hälfte desselben Monats an diesem Orte ganz fehlten; dass Organismen, welche zu einer Zeit unter den Kirschbäumen, nicht aber unter den Weinreben zu finden waren, später gerade nur unter diesen letzten sich fanden; als Beweis dafür, wie ungleich die Organismen verteilt sind, wird gezeigt, wie die in derselben Versuchsreihe an demselben Orte geöffneten Kolben oft einen höchst verschiedenartigen Inhalt hatten.

Ferner haben die Versuche mit den Vakuumskolben gelehrt, dass die Organismen der Luft oft in Gruppen oder Wolken auftreten, mit Zwischenräumen wechselnd, die entweder keimfrei

sind oder doch nur ganz vereinzelte Keime enthalten. Da die Organismen nicht in der Luft erzeugt werden, sondern ihre Bildungsherde an der Erde haben, muss der Inhalt der Luft von der Beschaffenheit der Erdoberfläche bedingt sein, die wieder in gewissen Richtungen von der Witterung abhängt.

HANSENs zahlreiche Analysen haben ferner dargethan, dass die Saccharomyceten verhältnismässig selten im Staube der Luft vorkommen. Ihre Anzahl in der Luft nimmt von Juni bis August in der Weise zu, dass die Kolben Ende August und Anfang September häufig mit diesen Pilzen infiziert werden, wonach eine Abnahme stattfindet. Was zu anderen Zeiten des Jahres in der freien Luft von Mikroorganismen dieser Art in den Kolben auftritt, muss als unwesentlich und zufällig betrachtet werden, und liegt daher ausserhalb der eigentlichen Hauptregel. Da die meisten Saccharomyces-Arten wahrscheinlicherweise, wie Saccharomyces apiculatus, ihren Überwinterungsort in der Erde und ihren Zeugungsort an den süssen, saftigen Früchten haben, so werden diese letzteren, nach Obigem, wie es scheint, als die wesentlichste Quelle der Infektion zu betrachten sein. Zu denselben Zeiten des Jahres treten auch die Bakterien in grösster Menge auf. Es liegt hierin eine bedeutende Gefahr für den praktischen Betrieb, indem die Würze, welche in dünner Schicht auf den offenen Kühlschiffen ausgebreitet ist, im genannten Zeitraume einer starken Infektion von den Luftkeimen ausgesetzt ist.

In etwas grösserer Zahl als die Saccharomyceten treten die Bakterien in den Kolben auf, und in noch grösserer Zahl die Schimmelpilze. Unter diesen findet man Cladosporium und Dematium als im Garten speciell hervortretend, danach Penicillium, seltener Botrytis, Mucor und Oidium.

Nachdem HANSEN so dargetellt hat, welche von den in der freien Luft befindlichen Mikroorganismen sich im Kolben mit sterilisierter Würze entwickeln können, geht er dazu über, seine Resultate von den Untersuchungen der verschiedenen Lokalitäten in der Brauerei mitzuteilen.

Wenn die Treber in der freien Luft liegen, senden sie, wie bekannt, saure Dämpfe aus, und da sie immer eine reiche Entwickelung von Bakterien enthalten, wenn sie eine kurze Zeit frei liegen, so drängt sich leicht die Frage auf: Wie ist die in

der Nähe der Treberhaufen sich befindliche Luft beschaffen? Es zeigte sich, dass von den in diesen Dämpfen geöffneten Kolben nur 30 pCt. infiziert wurden, davon 3,6 pCt. mit Saccharomyceten und 2,4 pCt. mit Bakterien, während Parallelversuche im Garten eine Infektion von ca. 44 pCt. ergaben, davon 8,5 pCt. Bakterien. Die Luft bei den Treberhaufen war hiernach ärmer an Bakterien als die Luft im Garten. Die reichlichste Infektion war die der Schimmelpilze, hier wie an allen anderen Orten. Nach einer genaueren Betrachtung kommt HANSEN zu dem Resultate, dass ohne allen Zweifel kaum ein einziger der in den Kolben auftretenden Organismen von den Trebern selbst herrührt. Jedenfalls steht der grosse Reichtum an Bakterien in den Trebern gar nicht in richtigem Verhältnisse zum obengenannten Befunde, welcher mit weit grösserer Wahrscheinlichkeit so gedeutet werden muss, dass die Luft ebensowenig hier als in anderen Fällen normal irgend welches Kontingent von Organismen von feuchten Oberflächen erhält.

Dies darf doch nicht dahin missverstanden werden, dass man ohne Gefahr die Treber an einem beliebigen Orte anhäufen und die Rester nach dem Aufnehmen der Witterung überlassen kann; es ist klar, dass darin eine grosse Gefahr liegt. Wenn diese Überbleibsel eintrocknen und in der Luft als Staub herumwirbeln, werden gleichzeitig Massen von Bakterienkeimen mit emporgehoben, und ganz zweifellos liegt hierin eine Quelle zahlreicher Bakterieninfektionen. Darum müssen auch die Plätze, wo Treber eine Zeit verweilt haben, mit Kalk- oder Chlorkalkwasser gewaschen werden.

In einem Korridor, der zu dem Raum führte, wo die Gerste gestürzt wurde, erhielten die Kolben immer die stärkste Infektion, die überhaupt gefunden wurde; namentlich war diese Luft sehr reich an Bakterien.

Auf den Malztennen war die Luft ebenfalls charakteristisch; sie enthielt immer eine sehr starke Schimmelvegetation Im vorliegenden Falle rührte diese Vegetation von Eurotium Aspergillus glaucus her, welcher sonst selten war. An dem Malze selbst trat, wie immer, am häufigsten das Penicillium glaucum auf.

Das grösste Interesse knüpft sich jedoch an Untersuchungen der verschiedenen Gärungsräume, teils auf Alt-Carlsberg, teils

in der Brauerei „N“. In den erstgenannten Räumen war die Luft ärmer an Organismen als an jeder andern der in der ganzen Analyse untersuchten Räumlichkeiten, in den Gärkellern der Brauerei „N“ wurde dagegen eine grosse Zahl der Kolben infiziert (55, 75 bis 100 pCt.). Die Organismen, welche in der Luft dieser Keller auftraten, waren: Saccharomyces cerevisiae, Mycoderma cerevisiae, S. Pastorianus, S. ellipsoideus, Torula Pasteur und andere hefenähnliche Zellen, ferner Penicillium, Dematium, Cladosporium und Stäbchenbakterien. HANSEN konnte daher hier, durch einen günstigen Zufall, die zwei Kontraste im Zustande der Luft an dem wichtigsten Orte eines jeden gärungsindustriellen Etablissements nachweisen: auf der einen Seite eine beinahe keimfreie Luft, auf der anderen Seite eine von Keimen schwangere Luft. Dass das Produkt an dem letztgenannten Orte in diesem Zeitraume auch das Gepräge dieses Zustandes an sich getragen haben muss, steht ausser allem Zweifel, und wir befinden uns hier einer der allerwichtigsten Thatsachen gegenüber, wenn die Sache mit den Augen des Praktikers gesehen wird. Die Luft im Gärungsraume selbst kann eine Welt von den Keimen enthalten, welche in der Gärungsindustrie die grössten Kalamitäten nach sich ziehen; es ist aber auch möglich, sie von diesen unsichtbaren Keimen frei zu halten, und es unterliegt keinem Zweifel, dass teils die Reinigung der in den Gärungsraum einströmenden Luft durch ein Salzwasserbad, teils die in den Kellern der Brauerei Alt-Carlsberg aufs strengste überwachte Ordnung und Reinlichkeit in direktem Verhältnisse zu diesem letztgenannten Resultate steht. HANSENs Untersuchungen enthalten daher hier wieder eine Mahnung, welche nicht häufig genug wiederholt werden kann. Wir kehren zu diesem Punkte zurück, wenn wir desselben Verfassers Untersuchungen über die Krankheiten des Bieres abhandeln werden.

---

Auf Grundlage einer grossen Reihe vergleichender Untersuchungen theilte HANSEN neulich die folgende Methode für die zymotechnische Luft- und Wasser-Analyse mit.

Das Prinzip für diese Luft- und Wasser-Analyse geht aus dem Folgenden hervor: Für den praktischen Betrieb, z. B. den

Brauereibetrieb hat es nur Bedeutung, zu wissen, ob das Wasser und die Luft solche Keime enthält, die sich in Würze und in Bier entwickeln können. Dies kann nicht, wie man aber früher annahm, durch die in der hygienischen Luft- und Wasser-Analyse verwendete Fleischwasserpeptongelatine ermittelt werden. Der Zymotechniker besitzt hier den grossen Vorteil gegenüber dem Hygieniker, dass er direkt experimentieren kann, nämlich mit derselben Flüssigkeit, welche in der Praxis benutzt wird, und HANSENs komparative Versuche haben klargelegt, dass man in dieser Weise verfahren muss. So gaben z. B. in einer Reihe von vergleichenden Untersuchungen entsprechender Wasserproben die Aussaaten in KOCHs Nährgelatine: 100, 222, 1000, 750 und 1500 Vegetationen in 1 *ccm* Wasser; dagegen in Würze 0, 0, 6,6, 3 und 9 Vegetationen; in Bier gaben diese Wasserproben alle 0 Vegetationen. In einer anderen Reihe gab KOCHs Gelatine für 1 *ccm* Wasser 222 Vegetationen, die Würzegelatine 30, aber keiner der mit dem Wasser infizierten Kolben mit Würze und Bier zeigte Entwickelung. In diesen Fällen entwickelten sich also von den sehr vielen lebenskräftigen Keimen des Wassers nur sehr wenige oder gar keine in der Würze oder im Biere.

In neueren Publikationen hat HANSEN wieder von anderer Seite das Unrichtige darin gezeigt, Gelatinen für Wasser- und Luft-Analysen zymotechnischer Art zu verwenden und dann die gebildeten Kolonieen in Würzekolben zu überführen. So wurde experimentell bewiesen, dass mehrere der abgeschwächten Bakterienkeime, welche im Staube der Luft und im Wasser sich befinden, sich zwar in der Nährgelatine entwickeln können, in der Würze selbst aber nicht; aber von einigen dieser Arten gilt es, dass, wenn sie zuerst eine neue Vegetation in der Gelatine gebildet haben, so werden sie dadurch so gestärkt, dass sie nun auch in dem weniger günstigen Nährboden, welche die Würze darbietet, sich entwickeln. Man wird also in solchen Fällen getäuscht. Aber ein noch wesentlicherer Einwand gegen das Gelatineverfahren liegt darin, dass einige eben für uns wichtige Organismen nicht zur Entwickelung kommen, wenn sie in dem abgeschwächten Zustande, in welchem sie sich im Staube der Luft und im Wasser gewöhnlich befinden, direkt in die Gelatine aufgenommen werden.

Auf der Grundlage von Beobachtungen dieser Art giebt HANSEN das folgende Verfahren an: Eine Reihe von FREUDENREICHschen Kolben[1]), welche sterilisirte Würze und Bier enthalten, werden mit kleinen Mengen des Wassers im ursprünglichen oder verdünnten Zustande infiziert. Für die Luft-Analyse werden die Keime mittels eines Aspirators direkt in Wasser oder zuerst in Baumwolle und danach in Wasser eingeführt. Nach 14tägigem Hinstande bei 25° C. werden die Kultur-Kolben untersucht. Wenn nur ein Theil von ihnen Entwickelung zeigt, die anderen dagegen steril bleiben, so kann man mit hinlänglich grosser Genauigkeit darauf rechnen, dass jeder der erstgenannten nur einen Keim empfangen hat. Man bekommt dadurch Aufklärung über die Zahl der entwickelungsfähigen Keime in einem gewissen Volumen; man giebt ferner hierdurch den verschiedenartigen Keimen günstigere Bedingungen für ihre freie Entwickelung. Die genaue Untersuchung ergiebt dann, zu welcher Art diese Keime gehören. — Analysen nach diesem Verfahren wurden auch von KARNEJEFF, KUKLA, TERRY und WICHMANN ausgeführt.

Zur Kontrolle der Filter wendet man am besten KOCHs Gelatineverfahren an.

---

# 3. Kapitel.

## Die Bakterien.

Je mehr unsere Kenntnis dieser niederen Organismen sich erweitert, desto schwieriger wird es, eine allgemeine Definition derselben zu geben. Man kennt sie in allen Formen, von den feinsten Pünktchen oder Kügelchen bis zu grünen algenähnlichen Fäden, und sie treten so ziemlich an allen möglichen Orten auf, unter den verschiedenartigsten Verhältnissen, als Ursache der Verwesung oder Fäulnis (Saprophyten), von Krankheiten (pathogene Formen) und von Gärungen (zymogene Formen).

Die erste Kenntnis dieser Formen erlangte man in der

1) Diese Kolben sind wie die CHAMBERLANDschen Kolben (Fig. 4 S. 15) eingerichtet, nur ist der Bauch cylindrisch.

Weise, dass man geringe Mengen der verschiedensten Stoffe unter das Mikroskop brachte und bei starker Vergrösserung beobachtete. Im faulenden Fleische fand man da sehr kleine kugelige Körper, welche sich deutlich durch Querteilung vermehrten (Mikrokokken, „Bacterium termo"); in der sauren Milch traten kurze, stäbchenförmige Körper auf (Bakterien), in verwesenden Pflanzenstoffen grössere, kugelförmige Körper (Makrokokken) und lange, feine Fäden (Bacillen und Leptothrix); im Zahnschleime fanden sich hingegen sehr feine gebuchtete, gleichsam geknickte Fäden (Spirillen, Spirochäten) u. s. w. Es lag daher




Fig. 8. Wuchsformen von Bakterien.
Kokkenformen (kugelig 1, 3, 4, 5, ellipsoid 2);
Stäbchenformen (gerade 6, 7, 8, 9, spindelförmige 10);
Schraubenformen (Kommabacillus 11—16);
Involutionsformen (17).
Keimende Sporen (18, 19).
(Nach KOCH, PRAZMOWSKY und HUEPPE.)

vorläufig nahe, diese Formen festzuhalten und als ebenso viele selbständige Arten zu beschreiben, und namentlich COHN hat sich in dieser Hinsicht Verdienste erworben, indem er das erste Bakteriensystem aufstellte.

Wir betrachten zunächst die Formen und das Individuum etwas näher. Wie gesagt treten die Bakterien in ihrer einfachsten Form als Kugeln von verschiedener Grösse auf bis zu solchen herab, welche bei sehr starker Vergrösserung gerade noch gesehen werden können, und nur bei ihrer Vermehrung durch Zweiteilung sich als Lebewesen kund geben. Man unterscheidet danach Makro-

und Mikrokokken. Von dem Kokkus (Fig. 1—5) findet ein allmählicher Übergang zum kurzen Stäbchen (Bacterium, Fig. 6, 7, 9) von diesem zum etwas langeren Stäbchen (Bacillus, Fig. 8) statt; wenn dieses sich in der Mitte erweitert und gegen die Enden zugespitzt wird, tritt die Clostridiumform (Fig. 10) auf; wird der Stab so stark verlängert, dass er mehr einem langen, feinen geraden Faden gleicht, wird er Leptothrix genannt; ist er (kurz oder lang) mehr oder weniger gebuchtet, geknickt oder gewunden, haben wir Vibrio, Spirillum, Spirulina oder Spirochäte (Fig. 11 bis 16); eine ganz besondere Form, welche wie verästelte Fäden aussieht, ist die Cladothrixform. Hierzu können noch hinzugefügt werden die merkwürdigen unregelmässigen, geschwollenen oder gebuchteten Formen, welche verschiedene Bakterien annehmen können, ohne dass die Ursache davon genauer bekannt wäre (Involutionsformen, Fig. 17). Man findet diese Formen leicht, wenn man eine Kahmhaut des Essigsäurebakteriums untersucht.

Wir wählen nun eine dieser Formen und unterwerfen sie einer genaueren Betrachtung bei ca. 1000facher Vergrösserung. Wie eine jegliche andere Zelle enthält sie ein Protoplasma, eine gleichartige, schwach lichtbrechende Masse, worin hie und da deutliche kleine Körner auftreten können, namentlich wenn die Zelle nicht in der kräftigsten Entwickelung sich befindet. Bisweilen findet sich mitten in der Zelle eine ganze helle Partie, welche nach Analogie der höheren Pflanzen als ein Saftraum, eine Vakuole, aufzufassen ist. Bei einigen ganz speciellen Bakterien wurden bestimmte feste Stoffe im Plasma nachgewiesen, z. B. Schwefelkörner in den Bakterien, welche in schwefelhaltigem Wasser leben; bei einigen Arten kann das Plasma unter gewissen Umständen von Jod blau gefärbt werden, was auf die Anwesenheit stärkeähnlicher Stoffe schliessen lässt.

Um diesen Plasmakörper herum treffen wir eine Zellwand oder Membram. Eine genaue Untersuchung durch Färbungen wird oft zeigen können, dass diese Membran in ihren äussersten Schichten gallertartig aufgequollen ist, was namentlich deutlich wird, wenn ganze Flocken von Bakterien angehäuft liegen. In chemischer Beziehung muss vorläufig angenommen werden, dass diese Zellwand für verschiedene Formen verschiedener Art ist. Bei einigen erinnert sie an die Cellulose der höheren Pflanzen;

bei andern scheint sie eher den Eiweissstoffen in ihrer Zusammensetzung zu ähneln.

Viele Bakterien enthalten blaue, rote, gelbe oder grüne Farbstoffe, welche sehr intensive für das blosse Auge empfindliche Farben hervorbringen können. Unter dem Mikroskop zeigt sich dann das einzelne Bakterium sehr schwach gefärbt. Es liegt noch nichts Sicheres darüber vor, wo der Farbstoff seinen Sitz hat. Einige Arten zeichnen sich dadurch aus, dass sie unter gewissen Ernährungsbedingungen leuchtend sind.

Eine merkliche Eigenschaft vieler Bakterien ist ihre — wenigstens scheinbar — freie Bewegung. Diese geht entweder schnell oder langsam von statten, indem sich die Bakterien um ihre Längsachse schwingen oder drehen, weite oder enge Buchtungen vornehmen. Bei einigen dieser beweglichen Formen beobachtet man bei starker Vergrösserung sehr feine Cilien oder Geisseln; inwiefern diese als Organe für die Bewegung aufgefasst werden müssen ist noch nicht entschieden und eben so wenig, ob sie ihren Ursprung von der Membran oder von dem Zellinhalte haben.

Die Vermehrung der Bakterien geht in verschiedener Weise vor sich. Man kann eine Vermehrung durch Teilung und durch Sporenbildung im Innern der Zelle unterscheiden. Die erste Art der Vermehrung ist bei den grösseren Formen in ihren Einzelheiten beobachtet worden: Es bilden sich feine Querscheidewände, welche nach und nach in der Dicke zunehmen und gallertartig werden; hierauf teilt sich der Faden in kleinere Stücken nach den Scheidewänden. Noch lange bevor man Spuren dieser Scheidewände beobachten kann, lässt sich durch Färbung des Fadens erkennen, dass er aus einer Reihe von Abschnitten besteht, deren jeder einem der später gebildeten Glieder entspricht.

Es wurde durch die Untersuchung der Entwickelungsformen der Bakterien in obengenannter Weise (in der neuesten Zeit namentlich von ZOPF) dargethan, dass dieselbe Bakterienart oft in sehr verschiedenen Gestalten auftreten kann, z. B. als Spirill, Leptothrix, Bacillus, Bakterium und Kokkus, und wir erhielten dadurch die wichtige Kenntnis zur Geschichte dieser Pflanzen, dass die angeführten Namen sehr oft nur Wuchsformen der Art angeben, aber nicht selbständige Arten. Die folgende

Frage ist dann: Unter welchen Bedingungen tritt die Art in dieser oder jener bestimmten Form auf? Hierüber wissen wir bis jetzt ziemlich wenig.

Bei vielen Bakterien findet ferner eine Vermehrung durch Sporen statt in der folgenden Weise: Das Plasma in der Zelle wird dunkler, oft deutlich granuliert; danach tritt ein kleiner, dunkler Körper auf, welcher schnell an Umfang zunimmt und gleichzeitig stark lichtbrechend wirkt; inzwischen verschwindet der allergrösste Teil des Plasmas der Zelle, indem dies zur Bildung der Spore benutzt wird, und diese erscheint in einer klaren Flüssigkeit, welche nach und nach verschwindet, eingelagert; zuletzt schrumpft die Zellwand ein und ist nur noch ein hinfälliger Anhang an der reifen Spore. Oft wurde dieses Organ Dauerspore genannt, und zwar aus zwei Gründen: Erstens weil die Spore faktisch eine weit grössere Dauerhaftigkeit und Resistenz gegen äussere Einflüsse als die vegetativen Fäden besitzt und zweitens, weil die Sporenbildung als Regel dann eintritt, wenn die Nahrung der Vegetation entweder erschöpft oder ungeeignet zur weiteren vegetativen Vermehrung der Organismen ist; die Spore dient dann dazu, das Leben während dieser kritischen Periode zu bewahren.

Sobald wieder günstige Nahrungs- und Temperaturverhältnisse eintreten, keimt die Spore. Sie nimmt zuerst an Grösse zu, und der Inhalt verliert sein starkes Lichtbrechungsvermögen. Es wächst dann aus der Spore eine Bakterie hervor, und bisweilen sieht man, wie die Wand der Spore berstet oder sich in zwei Klappen teilt (cf. Fig. 8: 18, 19). Der ausgewachsene Faden vermehrt sich danach in der gewöhnlichen Weise.

Die Bakterien werden jetzt bisweilen in „endosporen“ und „arthrosporen“ geteilt, von welchen die ersten ihre Sporen im Innern der früher vegetativen Fäden bilden, während die letzten nach den bisher gemachten Untersuchungen noch nicht eine solche innere Neubildung gezeigt haben; es sind hier losgetrennte Glieder vegetativer Zellen, welche Ausgangsglieder neuer vegetativer Generationen werden (z. B. Bact. aceti, Leuconostoc). Vielleicht wird man bei fortgesetzter Forschung auch bei den Arten dieser letzten Abteilung endogene Sporen finden können. Dass die genannten abgeschnürten Glieder als mit den Sporen parallel aufgestellt werden können, ist eine noch nicht hinlänglich begründete Annahme.

Zuletzt müssen wir noch ein Glied in der Formenlehre der Bakterien nennen, die sogenannte Zoogloeenbildung. Es ist in allen Zweigen der Gärungsindustrie bekannt, dass an Orten, wo die Reinigung nicht genau überwacht wird, schleimige, fettige Massen auftreten können, welche nach und nach an Dicke zunehmen. Die Ursache hierzu ist gewöhnlich eine Bakterienentwickelung, in der Weise, dass die einzelnen Zellen sich dicht an einander lagern und gleichzeitig in den äusseren gelatinösen Schichten der Zellwand stark anschwellen; während der fortgesetzten Vermehrung nimmt also die Schleimschicht an Dicke zu und kann gleichzeitig bestimmte, eigentümliche Formen annehmen. Solche schleimige Massen — in der Zuckerfabrikation als „Froschlaich" bekannt — treten sowohl auf fester Unterlage als auch in Flüssigkeiten auf.

PASTEUR machte die wichtige Entdeckung, dass es Bakterien und andere Mikroorganismen giebt, welche des freien Sauerstoffes zu ihrem Leben nicht bedürfen und welche eben bei Sauerstoffabschluss kräftige Zerlegungen des Gärmaterials hervorrufen. In biologischer Hinsicht unterschied er daher zwei Klassen von Mikroorganismen, indem er die soeben besprochenen die Anaërobien und die übrigen die Aërobien nannte. Später hat namentlich DUCLAUX darauf aufmerksam gemacht, dass es zwischen den beiden Extremen Übergangsformen giebt. Als Beispiel von anaëroben Bakterien kann PASTEURs Bakterium der Buttersäuregärung genannt werden.

Wir geben hiernach eine Übersicht über die wichtigsten der Arten, welche für die Gärungsindustrie von besonderer Wichtigkeit sind.

## 1. Die Essigsäure-Bakterien; invertierende, stärkelösende und peptonisierende Bakterien.

Die Essigsäure-Bakterien sind von der morphologischen Seite zuerst eingehend von HANSEN beschrieben worden. Die Richtigkeit seiner Untersuchungen wurde später von ZOPF, DE BARY und A. J. BROWN bestätigt.

Schon im Jahre 1838 wurde die Anschauung von TURPIN und KÜTZING ausgesprochen, dass die Essigsäuregärung von einem Mikroorganismus hervorgerufen wird, und KÜTZING be-

schrieb und abbildete diesen unter dem Namen Ulvina aceti. Sich an diese Vorgänger anlehnend, gab PASTEUR zuerst in seiner Abhandlung 1864 und danach besonders in den Études sur le vinaigre (1868) die experimentellen Belege für die Richtigkeit dieser Auffassung und basierte darauf eine Methode zur Essigfabrikation. Er nahm an, dass die Essigsäuregärung von einem Species hervorgerufen wurde, welchen er Mycoderma aceti nannte. Spätere Untersuchungen haben bekanntlich ergeben, dass es verschiedene Arten von Essigsäurebakterien giebt. Von der Anwendung eines bestimmten, ausgewählten Species ist also bei PASTEUR noch nicht die Rede. Seine Methode besteht darin, dass er der angewendeten Flüssigkeit — 2 Teile klarer Wein und 1 Teil Weinessig — eine grosse Oberfläche giebt, und er säet dann auf diese Oberfläche eine junge Vegetation von Essigsäurebakterien. Wenn die Temperatur, die Zusammensetzung der Flüssigkeit und überhaupt die Verhältnisse günstig sind, so geht die Essigsäurebildung schneller vor sich als durch die anderen in dieser Industrie angewendeten Methoden. Die Installation soll billiger und der Verlust an Alkohol soll kaum höher sein als bei der ORLEANschen Methode. Doch wurde PASTEURs Verfahren auch in Frankreich nur selten benutzt. Die Ursache der unsicheren Resultate kann teils in dem Umstande gesucht werden, dass die Zusammensetzung der Nährflüssigkeit variiert und wohl namentlich darin, dass die Kultur von Bakterien keine sichere Reinkultur war und daher auch Bakterienarten enthalten könnte, welche verschiedene Eigenschaften besitzen, verschiedene Lebensforderungen stellen und folglich auch verschiedenartige Produkte in wechselnden Quantitäten hervorbringen. Dies wird sich geltend machen, auch in den Fällen, wo die Vegetation nur von solchen Arten besteht, die alle Weinessig hervorbringen können. Schon in 1879 hat HANSEN gezeigt, dass unter den Formen des Mycoderma aceti wenigstens zwei scharf unterscheidbare Species verborgen sind: Bact. aceti und B Pasteurianum. Die absolut reine Kultur einer systematisch ausgewählten Art muss auch in dieser Industrie, wie er uns gelehrt hat, den Ausgangspunkt bilden.

Während PASTEUR im genannten Werke nicht ausdrücklich die Auffassung aufrecht hält, dass die Verbrennung des Alkohols

zu Essigsäure ein Prozess rein physiologischer Natur ist, spricht ADOLF MAYER diese Auffassung aus, und HANSEN hebt als sicher hervor, dass die Essigsäurebildung allgemein unter der Einwirkung von Bakterien vor sich geht. HANSENs Untersuchungen gehören ferner zu den ersten, die uns zeigten, dass eine bestimmte Gärung nicht nur durch eine Bakterienart, sondern durch mehrere vollführt werden kann; seit dieser Zeit sind viele Beispiele hiervon entdeckt worden. Beim Anbringen von Lagerbier im Thermostaten bei 30—34° C. bekam er eine kräftige Kahmhautbildung des Essigsäurebakteriums. Dasselbe tritt mit langen Ketten von stundenglasförmigen Gliedern auf, teils als Bakterium

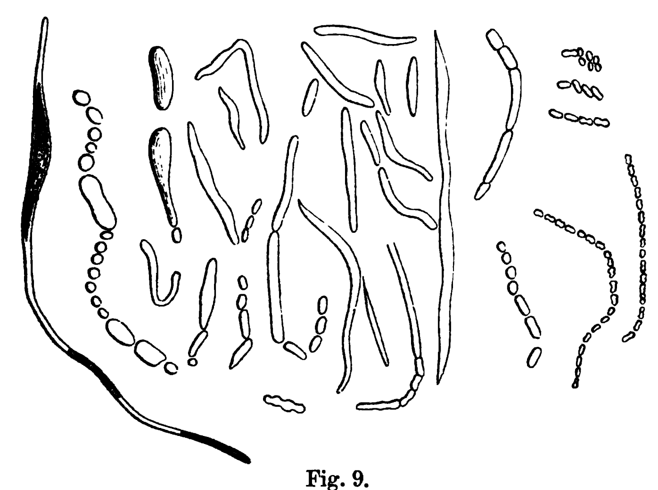


Fig. 9.
Bacterium aceti und Bact. Pasteurianum (nach HANSEN).

und Bacillus, teils mit gebuchteten Formen; eigentümlich für Bact. aceti ist, dass es oft sehr schnell die verschiedenartigen, unregelmässig geschwollenen Formen bildet, welche bei anderen Bakterien erst in einem weit vorgerückten Stadium auftreten und dann möglicherweise mit mangelhafter Ernährung in Verbindung stehen; dies kann jedoch für unseren Organismus nicht gelten. Wir haben hier auch eine der ersten Bakterien, bei welchem es nachgewiesen wurde, dass dieselbe Art in sehr verschiedenen Gestalten auftreten kann. Bei seinen Färbungs-Versuchen mit Bact. aceti entdeckte HANSEN wie gesagt, dass sich unter diesem Namen zwei

verschiedene Arten bergen, von welchen die eine — wie die meisten übrigen Bakterien — mit Jod gelb gefärbt wird, während die andere durch dasselbe eine blaue Färbung erhält. Für die erste behält er den alten Namen B. aceti bei, während er den blaugefärbten nach PASTEUR B. Pasteurianum nennt. In seiner Vorlesung teilte er neulich die nachstehenden neuen Beobachtungen über diese Art mit: Eine schöne Blaufärbung mittels Lösungen von Jod oder Jod-Jodkalium zeigen die Hautbildungen an Würze und Bier ebenso wie die Vegetationen an Würzegelatine, während die Vegetationen, welche sich auf Hefewasser und Fleischwasser-pepton-Gelatine entwickeln, gelb gefärbt werden; auch sehr alte Häute auf Bier zeigen die gelbe Reaktion. Es ist die von der Zellwand ausgehende Schleimbildung, welche blau gefärbt wird; ob der Inhalt der Zellen selbst gefärbt wird oder nicht, war bisher nicht möglich zu entscheiden. In Würzegelatine entwickelt Bact. Pasteurianum runde Vegetationsflecken mit glattem oder welligem Rande, wogegen die entsprechenden Flecken von Bact. aceti geneigt sind, Sternenformen anzunehmen. In morphologischer Beziehung verhalten die zwei Arten sich einander gleich. Sporen wurden nicht beobachtet. Eine Thatsache von praktischem Interesse ist diese, dass eine Reinkultur der zwei Essigsäurebakterien im Biere keinen Einfluss auf die Farbe oder Klarheit der Flüssigkeit ausübt. Man kann sich hierdurch bis zu einem gewissen Grade vergewissern, ob man diese Pflanzen für sich allein hat oder nicht, indem nämlich Bakterien im Biere sonst eine Trübung der Flüssigkeit herbeiführen. Um sich recht entwickeln zu können, fordert das Bact. aceti nicht nur sehr reichlichen freien Sauerstoff, sondern auch eine ziemlich hohe Temperatur. HANSEN fand, dass ca. 33° C. die günstigste war, wenn Carlsberger Lagerbier benutzt wurde. In einem wohl eingerichteten Lagerkeller (1—3° C.) hat man daher keinen Grund, Bacterium aceti zu fürchten. Sobald das Bier aber den Keller verlässt und höheren Temperaturen ausgesetzt wird, ist immer Gefahr vorhanden.

In Sauerteig, namentlich wenn dieser alt und stark sauer geworden war, fand PETERS neulich ein Essigsäurebakterium, welches sich von B. aceti und B. Past. unterscheidet. Die Kolonieen in gewöhnlichen Plattenkulturen sind kreisrund, im durchfallenden

Lichte von kräftig brauner Farbe und homogenem Aussehen; die oberflächlichen Kolonieen breiten sich flächenartig. In Stichkulturen wächst es nur an der Oberfläche einigermassen kräftig und bildet eine dünne bräunlich-weisse Schicht. Die einzelnen Individuen sind 1,6 $\mu$ lang und 0,8 $\mu$ breit, am einen Ende abgestumpft, am anderen zugespitzt; sie kommen einzeln oder zu zweien, selten zu vieren verbunden vor; in den Zellenpaaren liegen die stumpfen Enden einander selbst zugewendet. In alten Kulturen kommen Individuen der doppelten Grösse vor. Das Bakterium zeigt keine Bewegung. In Hefewasser mit 5 pCt. Alkohol wird zunächst die ganze Masse getrübt, dann tritt an der Oberfläche ein dünner Schleier auf, welcher nach und nach schleimig wird. Auf Bier zeigte sich dieser Organismus von Bact. aceti verschieden, wesentlich dadurch, dass die Zellen eigentümliche Form haben und selten zu mehr als zwei vereinigt sind. Vielleicht ist dieses Bakterium dasselbe wie das von DUCLAUX beschriebene.

PASTEUR hat nachgewiesen, dass bei der Oxydation alkoholischer Flüssigkeit Äthyl-Alkohol zu Essigsäure, und bei fortgesetzter Oxydation diese letztere wieder zu Kohlensäure und Wasser umgebildet wird. Dies wurde in der letzten Zeit von A. J. BROWN bestätigt, welchem wir die ausführlichsten Untersuchungen über die chemischen Wirkungen der Essigsäurebakterien verdanken.

Nach Mitteilungen von HANSEN giebt es auch unter den im Biere allgemein vorkommenden Bakterien mehrere Arten, welche invertierende Fermente ausscheiden. Innerhalb dieser Arten findet sich wieder eine Gruppe, welche zwar in einer reinen Saccharoselösung eine invertierende Wirksamkeit entfaltet, die aber damit innehält, wenn ein Hefenwasserdekokt zugesetzt wird. Ähnliche Verhältnisse wurden von WORTMANN bei solchen Bakterien beobachtet, welche diastatische Fermente entwickeln. Die Bildung chemisch löslicher Fermente ist überhaupt sehr allgemein verbreitet in der Welt der Bakterien, und hierin findet man eines der Mittel, durch welche diese Lebewesen eine so grossartige chemische Wirksamkeit im Haushalte der Natur entfalten.

Ein Bacillus, welcher Stärke zu lösen vermag, fand z. B.

PETERS im Sauerteige. Er bildet in gewöhnlichen Gelatineplattenkulturen eigentümliche eingebuchtete Kolonieen, aus langen, etwa 0,5 μ dicken Fäden bestehend; in jungen Kolonieen sind die Fäden kürzer und beweglich. In Bierwürze bildet der Bacillus lebhaft bewegliche Stäbchen, welche nach und nach eine Haut an der Oberfläche hervorbringen. Die Sporen sind stäbchenförmig und ihr stark lichtbrechender Inhalt ist namentlich in den Polen gelagert.

Auch ein Bacillus, welcher peptonisierende Fähigkeit besitzt, wurde von PETERS unter den Organismen des Sauerteiges beschrieben. Aus den Sporen wachsen Stäbchen hervor, welche sich zu langen Fäden ausbilden, die sich wieder in Stäbchen teilen. In gewöhnlicher Nährgelatine wächst diese Art nicht oder sehr schwer, dagegen leicht und kräftig, wenn „lösliche Stärke“ zugesetzt wird; die Gelatine wird schnell verflüssigt. Die Sporen treten reichlich in Kulturen in neutralisiertem Hefewasser auf. In Hängetropfkulturen zeigte sich, dass kleine Stücke von gekochtem Hühnereiweiss von dieser Art stark angegriffen oder ganz gelöst wurden.

## 2. Die Buttersäure-Bakterien,

welche in der Natur sehr verbreitet zu sein scheinen, treten in der zuckerhaltigen Maische immer auf und können, wenn diese längere Zeit auf gewissen Temperaturen erhalten wird, sich stark entwickeln und einen hemmenden Einfluss auf das Alkoholferment ausüben. Man kennt eine Art (Clostridium butyricum) in Gestalt von kurzen und langen Fäden und Stäbchen, welche gerade oder schwach gekrümmt sein können; vor der Bildung der Sporen in den Stäben schwellen diese an und bilden, wie die Figur zeigt, eigentümlich spindelige, citronenartige, ellipsoidische oder Keulen-Formen; gleichzeitig tritt der merkwürdige Fall auf, dass sie durch Jod blau gefärbt werden. Bei der Keimung der Spore berstet ihre Aussenwand, und der Keimfaden wächst in derselben Richtung hinaus wie die Längsachse der Spore. PASTEURs Beobachtungen zufolge kann das Buttersäureferment seine Lebensfunktionen erfüllen, ohne Zutritt zum freien Sauerstoff der Luft zu haben. Unter der Gärung vermag sie Stärke und Cellulose zu lösen. Das Clostridium butyricum

entwickelt sich am kräftigsten bei einer Temperatur von nahezu 40° C. und wird in zuckerhaltigen Flüssigkeiten namentlich dann dominieren können, wenn das Milchsäureferment im voraus einen Teil des Zuckers zu Milchsäure umgebildet hat.

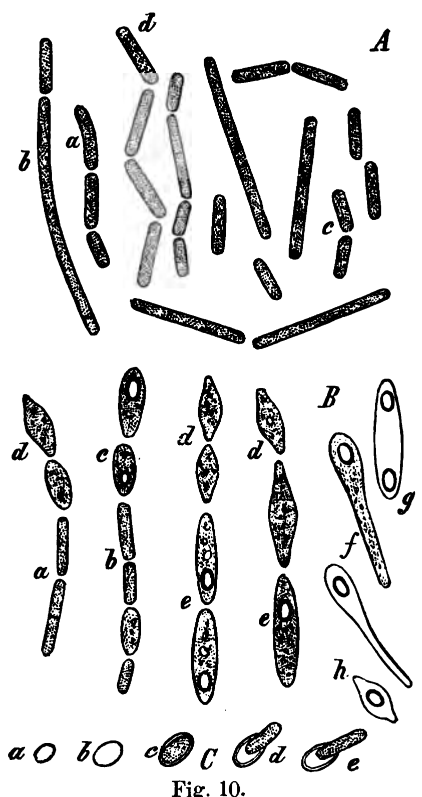



Fig. 10.
Clostridium butyricum PRAZM.

*A* vegetative Zustände, *c* Kurzstäbchen, *d* Langstäbchen, bei *a* und *b* vibrionenartig gekrümmte Stäbchen und Fäden. *B* Dauersporenbildung; *b*, *d* Stäbchen vor, *c*, *e* während, *f*, *g*, *h* nach der Dauersporenbildung; *c* von ellipsoidischer, *d* und *h* von citronenförmiger, *e*, *g* von spindeliger, *f* von kaulquappenartiger Form. Bei *a* Stäbchen, die noch im vegetativen Zustande befindlich sind. *C* Keimung der Dauersporen; die Spore *a* schwillt in *b* an, *c* zeigt dann die Differenzierung der Membran in Exo- und Endosporium. Aus dem polaren Riss der Spore tritt der vom Endospor umgebene Inhalt in Form eines Kurzstäbchens heraus, *d*, das sich bei *e* bereits verlängert hat (nach PRAZMOWSKI).

Aus demselben Grunde tritt es während des Lagerns und der Reife der Käse stark auf und trägt dazu bei, diesen ihren eigentümlichen Geruch und Geschmack zu geben. Nach FITZ können die Sporen die Temperatur des Kochpunktes vertragen in einer Zeitdauer, welche selbstverständlich hier wie immer von ihrem Zustande und von der Beschaffenheit des Stoffes abhängig ist; FITZ giebt 3—20 Minuten an. Sie können jedoch auch bei einer niedrigeren Temperatur getötet werden, wenn diese lange genug innegehalten wird; so werden sie nach einer 6stündigen Erwärmung in Traubenzuckerlösung bei 90° C. getötet, in Glycerin bei derselben Temperatur erst nach 6—11 Stunden. Findet sich Buttersäure im Biere in merkbarer Menge, so bekommt dies einen sehr unangenehmen Geschmack.

GRUBER fand unter dem Namen Clostridium butyricum drei wohl unterscheidbare Arten vereinigt, von denen zwei ausschliesslich anaërobiotisch zu leben vermögen. Die erste dieser letztgenannten Arten besteht aus geraden oder schwach gekrümmten Stäbchen, welche bei der Sporenbildung spindel- oder tonnenförmig werden; die zweite Art besteht aus stark gekrümmten vegetativen Stäbchen, in welchen die Sporen endständig gebildet werden. Die erste Art bildet auf Nährgelatine Kolonieen, welche im durchfallenden Lichte schwarzbraun bis schwarz sind, die andere gelbliche bis gelbbraune Kolonieen. Die dritte Art ist zwar auch bei Ausschluss von Sauerstoff des Wachstums und der Erregung von Gärung fähig, wird doch durch Sauerstoffzutritt entschieden in ihrer Entwickelung gefördert und vermag nur dann Sporen zu bilden. Die vegetativen Stäbchen sind cylindrisch, bei Sporenbildung werden die Stäbchen spindelförmig, und im Centrum der Spindel bildet sich die grosse Spore. Die Kolonieen auf Nährgelatine sind von gelblicher Farbe.

Alle drei Arten bilden aus Kohlehydraten Buttersäure und Butylalkohol.

Die Buttersäuregärung wird also wie die hiernach zu beschreibende Milchsäuregärung nicht ausschliesslich durch eine Art hervorgebracht. Wenn die Buttersäuregärung in Brennereien, Brauereien und Presshefefabriken eintritt, wird man in mehreren Fällen ganz andere Bakterien als die unter dem Namen Clostridium butyricum beschriebenen finden.

### 3. Milchsäure-Bakterien.

Die verschiedenen Bakterienarten, welche Milchsäuregärung hervorrufen, sind noch nicht genau bekannt; die erste Mitteilung über eine „Milchsäure-Hefe“ finden wir in PASTEURs berühmter Abhandlung von 1857. In Études sur la bière hat er auf der ersten Tafel eine solche abgebildet, welche als kurzes Stäbchenbakterium und Mikrococcus auftritt. Später hat HUEPPE in einer spontanen Milchsäuregärung ein Bakterium gefunden, welches den Milchzucker und andere Saccharate in Milchsäure überführt unter gleichzeitiger Bildung von Kohlensäure. Es besteht aus kurzen, plumpen, endständig endogene Sporen bildenden Zellen. Im Speichel und Zahnschleim fand er zwei Mikrococcen-Species, welchen gleichfalls die Fähigkeit zukommt, aus Zucker Milchsäure zu bilden. Auch unter den pigmentbildenden Bakterien finden sich Arten, welche neben ihrer Pigmentgärung aus Milchzucker so viel Milchsäure zu bilden vermögen, dass das Kasein der Milch in gelatinöser Form zum Gerinnen kommt; hierzu gehört nach HUEPPE der berühmte rote Mikrococcus prodigiosus und nach KRAUSE eine pathogene Form, der Mikrococcus der Osteomyelitis.

Im Sauerteig fand PETERS ein Bakterium, welches eine ausgeprägte Milchsäuregärung hervorruft. Es bildet in Plattenkulturen kreisrunde Kolonieen mit konzentrischer Schichtung; in Stichkulturen wächst diese Form innerhalb der Gelatine fast gar nicht, dagegen bildet sie an der Oberfläche eine starke, weisslich gelbe Auflagerung, welche in den dickeren Schichten eine leicht rötliche Färbung zeigt. In Strichkulturen entsteht längs des Striches eine wulstige Auflagerung von derselben Färbung. Die Stäbchen zeigen eine lebhafte, schwärmende Bewegung; auf neutraler Hefewasser-Zuckerlösung bei 30° C. bildet die Art nach einiger Zeit eine schleimige Haut; die Stäbchen sind hier zu langen Fäden ausgewachsen. Sporenbildung wurde nicht beobachtet.

Der von LINDNER untersuchte Pediococcus acidi lactici giebt, in neutraler Malzextraktlösung bei 41° C. kultiviert, eine stark saure Reaktion; sowohl in nicht sterilisierter Lösung dieser Art wie in nicht sterilisiertem Heudekokt entwickelt sich diese

Bakterie nach LINDNER bei der genannten Temperatur so stark, dass alle anderen Organismen in ihrer Vermehrung unterdrückt werden. Auf chemischem Wege wurde festgestellt, dass die grösste Menge der reichlich gebildeten Säure Milchsäure war. Wenn eine Malzmaische oder Malzroggenmaische bei 41° C. gehalten wird, so entwickelt der Pediococcus sich stark, und die stäbchenförmigen Milchsäurebakterien treten zurück. In neutraler Malzextraktlösung wird der Pediococcus nach 5 Minuten langer Einwirkung von 62° C. getötet. Auf Gelatinen kommt er schwierig fort; nur im Impfstriche in neutraler Malzextraktgelatine bilden sich in der Tiefe ganz kräftige Kolonieen von weisser Farbe. Er scheint überhaupt besser bei Abschluss der Luft als bei Luftzutritt zu gedeihen.

Ausser den genannten haben mehrere andere Forscher sich mit Studien über Milchsäurebakterien beschäftigt, so auch PASTEURs berühmter Mitarbeiter DUCLAUX. In der neuesten Zeit beschrieb GROTENFELT Arten, die wohl als neue aufzufassen sind; es gelang ihm wenigstens nicht, sie mit den von HUEPPE und MARPMANN aufgestellten zu identifizieren. Bei einigen wurde beobachtet, dass sie aus dem Zucker neben Milchsäure auch Alkohol abspalten; er spricht daher die Vermutung aus, dass sie möglicherweise bei der Aromabildung in der Butter beteiligt sein mögen. Greifbare Verbesserungen in der Milchwirtschaft wurden durch die bakteriologischen Untersuchungen bisher nicht hervorgerufen. Es wird aber in den verschiedenen Ländern jetzt eifrig dahin gestrebt, in Frankreich seit Jahren von DUCLAUX, und es ist daher zu erwarten, dass es in nicht langer Zeit geschehen wird.

DELBRÜCK fand, dass in einer Maische, aus Trockenmalz und Wasser dargestellt, zuerst bei ca. 50° C. Milchsäure gebildet wurde, und er zog daraus den Schluss, dass das hier wirksame Milchsäureferment seine Optimumstemperatur bei diesem Wärmegrade hat.

Die Milchsäuregärung tritt in der Brauerei schon bei dem Mälzen auf, ferner in der Würze und bei der Nachgärung; in den belgischen, durch „Selbstgärung“ hergestellten Bieren bildet sich Milchsäure in grosser Menge, wodurch die Biere einen scharfen Geschmack bekommen. In modernen untergärigen Brauereien sucht man sowohl Milchsäure- wie überhaupt Bakterien fern von der Gärung zu halten. „In der Brennerei,“ sagt MAERCKER,

„sind sie vorläufig noch als ein notwendiges Übel anzusehen. Die Erzeugung der Milchsäure erfolgt bei der Hefebereitung, und ihr Wert scheint sich darauf zu reduzieren, dass dieselbe die Entwickelung von Bakterien verhindert und auf diese Weise die Reingärung der Alkoholhefe ermöglicht“.

## 4. Mikrococcusartige Organismen.

Ausser dem obengenannten Pediococcus acidi lactici treten in gärenden Flüssigkeiten eine Menge anderer kugelförmiger Bakterien auf, deren Lebensbedingungen nur sehr unvollständig bekannt sind. Sowohl bei der Untergärung wie bei der Obergärung (namentlich in Brennereien und Presshefefabriken) finden sich Mikrococcen, deren schädlicher Einfluss in den Fachzeitschriften stark hervorgehoben wurde. Durch direkte Experimente wurde dies jedoch nur in einem ganz vereinzelten Falle (siehe unten) wirklich nachgewiesen. Im untergärigen Lagerbiere treten diese Formen als mehr oder weniger kugelige, wassergraue Körperchen, teils vereinzelt, teils in Gruppen, meist zu vieren vereinigt, auf; sie wurden von HANSEN unter dem Namen Sarcina (Fig. 11) beschrieben.

Fig. 11. Sarcina.

REINCKE beobachtete oft solche Formen sowohl im untergärigen wie im obergärigen Biere. Er fand, dass das Lagerbier unter solchen Umständen schnell eine bedeutende Sedimentbildung hervorbrachte und einen schlechten Geruch und Geschmack hatte. Das Berliner Weissbier nahm oft eine rote Farbe an und enthielt dann viele Sarcinaformen; die Entwickelung dieser Formen nahm nach einigen Tagen bei etwas erhöhter Temperatur beträchtlich zu. Temperaturen von 10—14° C. scheinen nach REINCKE für diesen Fall besonders günstig zu sein. Er hebt jedoch mit Recht hervor, dass es nicht sicher ist, ob Sarcina oder die ebenfalls auftretenden Stäbchenbakterien die eigentliche Ursache zu der genannten Krankheit sind — man weiss nur, dass die Sarcina im roten Biere abnormale Zustände kennzeichnet; ob sie Ursache oder Wirkung ist, muss durch exakte Forschung bewiesen werden.

In der frischen Schlempe der Branntweinmaischen, welche zur Fütterung benutzt wird, fand BRÄUTIGAM einen sarcina-

artigen Mikrococcus, welcher pathogene Eigenschaften besass. Ob er im Zusammenhange mit der sogenannten Schlempemauke bei den Haustieren steht, wurde noch nicht durch direkte Versuche bestimmt.

LINDNER untersuchte eine Reihe von sarcinaartigen Organismen und gab wertvolle Beiträge zur Aufklärung der Lebensverhältnisse dieser Formen. Der sogenannte Pediococcus cerevisiae tritt in den Kulturen nur als Kokken, Diplokokken oder Tetraden auf. Durch Kulturen auf Fleischsaftpeptongelatine, welche zum Teil mit Gipsblättchen bedeckt waren, zeigte sich, dass Zutritt der Luft das Wachstum der Kolonieen dieses Bakteriums fördert; in den ersten Tagen waren sämtliche Kolonieen farblos; später zeigte sich in denselben der Beginn einer gelblichen resp. gelblich-bräunlichen Färbung. Die Gelatine wurde nicht verflüssigt. Auf Fleischsaftgelatine bei Strichkultur gab dieser Organismus einen grauweissen, feuchten, in dünnen Schichten lebhaft irisierenden Streifen mit ziemlich glatten Rändern; im Impfstich entwickelte er sich in allen Teilen desselben und bildete auf der Oberfläche der Gelatine ein weisses Köpfchen, welches sich blattartig ausbreitete. Auf gekochten Kartoffelscheiben gedeiht der Pediococcus nur spärlich; in solchen älteren Kulturen treten eigentümliche Involutionsformen auf. In Fleischsaftgelatine wurde der Organismus nach 8 Minuten langer Einwirkung bei 60° C. getötet, dagegen nicht bei 50—55° C. nach 12 Minuten. Auf gehopfter Bierwürze bildet er Bodensatz und später eine Haut. Die Säurebildung in der Flüssigkeit nach Einwirkung des Pediococcus ist sehr schwach, und der Verfasser vermutet, dass Spuren von Milchsäure gebildet werden. LINDNER erklärt, dass es ihm in keinem Falle gelang, in Würze oder Bier eine Krankheit hervorzurufen, wenn er diese Flüssigkeiten mit einer kräftigen Vegetation des genannten Bakteriums infizierte, und er bemerkt daher auch, dass möglicherweise gar nicht der Pediococcus, sondern andere Bakterien, welche gleichzeitig in dem angegriffenen Biere zu finden sind, die Geschmacksänderung im kranken Biere herbeiführen; dagegen vermutet er, dass er eine Trübung hervorruft. Man findet solche sarcinaartigen Organismen an sehr verschiedenen Orten. Die für jede Species eigentlichen Entwickelungsherde sind jedoch noch nicht bekannt.

Neulich beobachtete A. PETERSEN, dass eine ausgiebige Entwickelung von Pediococcus cerevisiae im untergärigen Lagerbier stattfand, ohne dass irgend eine Krankheit sich zeigte; das betreffende Bier war im Gegenteil klar und haltbar, und es hatte einen feinen Geruch und guten Geschmack. (Nach mündlicher Mitteilung.)

Die Frage über Sarcina-Krankheiten im untergärigen Biere ist also eine noch nicht erledigte.

Im Berliner Weissbier, welches „fadenziehend" geworden war, fand LINDNER eine starke Entwickelung eines Pediococcus. Durch Infektion sterilisierter Weissbierwürze mit Reinkulturen dieser Art wurde die Krankheit hervorgerufen. Dagegen zeigte dieser Organismus keinen Einfluss auf gehopfte Bierwürze oder untergärige Biere.

PASTEUR hat in Études sur la bière Tab. I Fig. 4 rosenkranzförmige Ketten von kugelförmigen Organismen abgebildet, welche den Wein, das Bier und die Würze fadenziehend machen sollen. Während der Entwickelung des Schleimes wird Kohlensäure und oft zugleich Mannit gebildet. Nach allen Analogieen darf dieser Schleim als ein der bei den Bakterien allgemein auftretenden Zoogloeenbildung nahestehendes Phänomen aufgefasst werden; er wird jedoch auch als ein Umwandlungsprodukt des Zuckers aufgefasst.

Der sogenannte Dextrangärungspilz (Leuconostoc mesenterioides), Fig. 12, tritt spontan in dem Rübensaft und der Melasse der Zuckerfabriken auf, wo er grosse, schleimige Klumpen (Froschlaich) bildet und sich reissend schnell vermehrt. Nach VAN TIEGHEM vermag der Pilz ein Ferment auszuscheiden, welches den Rohrzucker invertiert, den er dann zu seiner Ernährung benutzt. Da er sich so stark vermehrt, kann er in kurzer Zeit bedeutende Quantitäten von Zucker verzehren. Die von dem Pilze gebildete Schleimmasse (Dextran) ist glashell und schliesst in sich die perlschnurartigen Fäden des Pilzes ein.

## 5. Kephir-Organismen.

Die sogenannte „Kephir", über welche KERN Aufklärungen gegeben hat, ist eine schäumende, alkoholhaltige, saure Milch,

welche von den Bewohnern des Kaukasus aus Kuh-, Ziegen- oder Schafsmilch zubereitet wird. Sie wird dadurch dargestellt, dass man zur Milch ein eigentümliches Ferment, die Kephirkörner, setzt. Es sind dies weisse oder gelbliche, unregelmässig geformte, unebne Körner von der Grösse bis zu einer Walnuss und von zäh

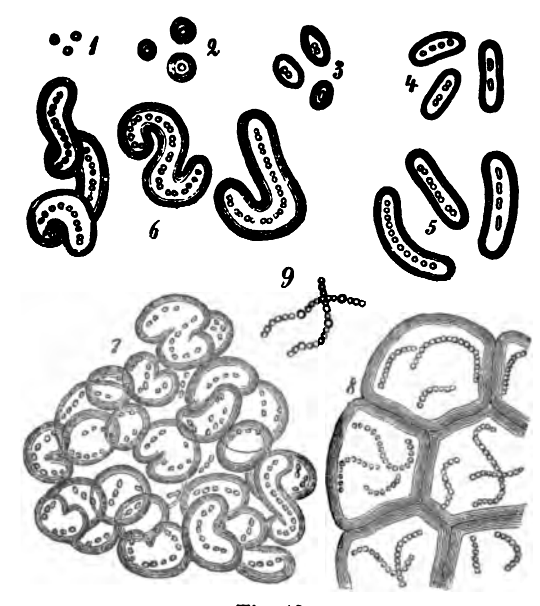



Fig. 12.

Froschlaichpilz, Leuconostoc mesenterioides.

1 Sporen, 2 Sporen nach der Auskeimung, mit stark vergallerter Membran, 3, 4, 5, 6 successive Stadien der Kokkenteilung und Vergallertung bis zu gekrümmten Formen, 7 ein Glomerulus von kleinen Zoogloeen, 8 Durchschnitt durch ein älteres Stadium einer zusammengesetzten Zoogloea mit ziemlich langen torulaartigen Fäden, 9 Kokkenketten, von einzelnen Sporen unterbrochen, die sich vor den Kokken durch ihre Grösse auszeichnen. (Nach van Tieghem und Cienkowski.)

gelatinöser Konsistenz, welche bei Austrocknung knorpelig spröde werden. Die wesentlichste Masse dieser Körner besteht aus stäbchenförmigen Bakterien, welche zu Fäden verbunden sind und schleimartige Membranen entwickelt haben. Kern nennt dieses Bakterium Dispora caucasica. Ferner finden sich in den

Kephirkörnern hefenähnliche Pilze, darunter verschiedene Arten von echten Saccharomyceten. Beim Zubereiten der Kephir giesst man zuerst ein wenig Milch auf die Körner und lässt sie 24 Stunden stehen, giesst die Milch ab und bewahrt die Körner zu fernerer Verwendung auf. Diese Milch wird nun mit frischer Milch vermischt und auf Flaschen, die gekorkt werden, oder auf zugebundene lederne Säcke gefüllt; nach einigen Tagen hat sie eine Gärung entwickelt. Sie enthält jetzt bis zu 2 pCt. Alkohol. Dieses Resultat wird wahrscheinlich gleichzeitig von der erwähnten Dispora und den hefenähnlichen Zellen in Verbindung mit dem möglicherweise in der Milch immer vorkommenden Milchsäurebakterien hervorgerufen. Die letztgenannten verwandeln dann einen Teil des Milchzuckers in Milchsäure; der Alkohol und ein Teil der Kohlensäure rührt wahrscheinlich von den hefenähnlichen Zellen her. Da die vergorene Milch eine bedeutend geringere Menge von geronnenem Kasein als die gewöhnliche Sauermilch enthält, wird ferner angenommen, dass die genannte Dispora dazu imstande ist, das geronnene Kasein teilweise zu verflüssigen (peptonisieren), vielleicht gerade mit Hilfe der von ihm ausgeschiedenen gelatinösen Masse, welche sich in den Kephirkörnern findet, während sie in der gärenden Milch nicht vorhanden ist. — Lässt man eines der genannten Kephirkörner in Milch liegen, dann wächst es sehr langsam und erreicht, nach DE BARYs Versuchen, erst nach mehreren Wochen seine doppelte Grösse; der genannte Forscher hält es für wahrscheinlich, dass unter solchen Verhältnissen einzelne Disporaglieder austreten, welche zu neuen Kephirkörnern heranwachsen. Nach dem von A. LEVY angegebenen Verfahren kann die Kephir auch ohne Zusatz von KERNs Fermentorganismen dargestellt werden. Wenn man sauer werdende Milch häufig stark umschüttelt, so erhält man ein moussierendes alkoholhaltiges Kephirgetränk, welches sich in Geschmack u. s. w. nicht bemerkbar von dem Körnerkephir unterscheidet. Nach Angabe von DE BARY enthielt die Schüttelkephir ca. 1 Vol.-pCt. Alkohol, eine Körnerkephirprobe 0,4 Vol.-pCt. (Schmiedeberg). Nach den neuesten Untersuchungen von DUCLAUX, GROTENFELT und ADAMETZ giebt es auch Hefepilze, die selbst den Milchzucker vergären können, ohne Beihilfe von Bakterien.

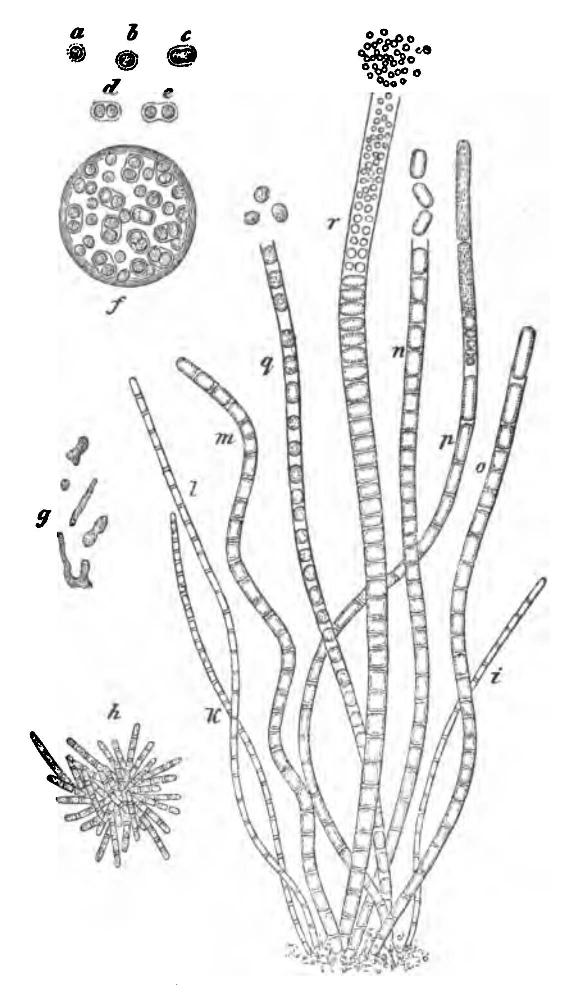



Fig. 13. Crenothrix Kühniana nach ZOPF.

*a—e* Kokken in verschiedenen Stadien der Teilung, *f* kleine rundliche Kokkenzoogloea, *g* (natürliche Grösse) Zoogloea, *h* Kolonie von kurzen, aus stäbchenförmigen Zellen bestehenden Fäden, durch Auskeimung eines Kokkenhäufchens entstanden; *i—r* Fadenformen, z. T. gerade, z. T. spiralig gekrümmt (*l*, *m*) von sehr wechselnder Dicke, mehr oder minder ausgesprochenem Gegensatz von Basis und Spitze, verschiedenen Teilungsstadien ihrer Glieder und Scheidenbildung. Der bescheidete Faden *r* zeigt am Grunde Kurzstäbchen, die mehr nach oben in niedrige Cylinderstücke geteilt sind. An der Spitze sieht man die durch Längsteilungen der Cylinderscheiben entstandenen Kokken.

### 6. Crenothrix.

Wie wir oben den Heubacillus (Bacillus subtilis) als eines der in der Luft und auf den Pflanzen am häufigsten auftretenden Bakterien besprachen, so müssen wir noch zuletzt einen der im Wasser am häufigsten vorkommenden Bakterien nennen: die Crenothrix Kühniana oder Brunnenpest (Fig. 13).

In jedem Wasser, welches organische Substanzen enthält, tritt dieser Pilz (häufig von Beggiatoa alba begleitet) auf; bisweilen entwickelt er sich zu einer solchen Mächtigkeit, dass er das Wasser unbrauchbar machen kann. So wurden nach ZOPF durch diesen Pilz in den Wasserleitungen Berlins, Lilles und denen russischer Städte grosse Kalamitäten hervorgerufen. Durch seine Fähigkeit, Eisenverbindungen in seinen Wänden einzulagern, bildet er rötliche oder braune Flocken im Wasser. Seine Formen sind sehr schön: er tritt in Form von Kokken (*a—f*), welche durch Teilung und Schleimbildung Zoogloeen bilden, auf; diese Kokken können auch zu Fäden auswachsen, welche gegliedert und mit deutlicher Scheide versehen sind (*h*, *i—r*); sie nehmen an Dicke gegen die Spitze hin zu; wenn sie ein gewisses Alter erreicht haben, teilen sie sich innerhalb der Scheide in kleinere Stücke, welche sich abrunden und als Stäbchen, Makro- oder Mikrokokken heraustreten; diese können im Wasser herumschwärmen. Eine genauere Kenntnis der Lebensverhältnisse dieses schönen Bakteriums besitzen wir noch nicht.

---

## 4. Kapitel.

## Die Schimmelpilze.

---

Die Schimmelpilze greifen gewöhnlich in einer etwas anderen Weise als die Bakterien in die Gärungsindustrie ein. Während diese — in den Brennereien als Regel, in den Brauereien ausnahmsweise — unter der Gärung mit grosser Kraft auftreten und dadurch bedeutsame Änderungen im Verlaufe und in den

Resultaten der Gärung hervorrufen können, treten dagegen die Schimmelpilze meistens ausserhalb des eigentlichen Gärungsfeldes auf, indem sie sich auf Gefässen, Geräten, Räumlichkeiten, auf dem Grünmalze und der ruhenden Hefenmasse einnisten. Demzufolge haben die Schimmelpilze mehr untergeordnete aber nichtsdestoweniger recht wesentliche Bedeutung. Man untersuche nur genauer einen solchen Schimmelrasen, welcher sich an der Decke oder der Wand eines Gärungsraumes oder am Rande eines Gefässes entwickelt hat; es wird sich dann sehr bald ergeben, das wir es so gut wie niemals mit einer Schimmelvegetation allein zu thun haben; es treten beinahe immer unter den Schimmelfäden Bakterien und hefenähnliche Zellen auf. Die Fäden der Schimmelpflanze strecken sich in die Höhe und heben dadurch die fremden Elemente, welche in dieser exponierten Stellung leichter, teils von den Arbeitern, teils von der Luft fortgeführt werden. — Auf den stärkehaltigen Rohstoffen treten während ihrer Vermälzung alle Arten von mikroskopischen Mikroorganismen auf. Wenn gewöhnlich die Schimmelpilze als die ärgsten Feinde erwähnt werden, dann hat dies gewiss darin seine Ursache, dass sie während der Entwickelung selbst dem blossen Auge sichtbar sind und sich so ganz unmittelbar unserer Aufmerksamkeit aufdrängen. Würde man die Anzahl als entscheidend aufstellen, dann müssten sicherlich die Bakterien, welche auf dem Grünmalze immer in grosser Zahl zugegen sind, in erste Linie gestellt werden. Von dieser Seite beurteilt, darf es denn auch als zweifelhaft angesehen werden, ob man den Schimmelpilzen (Penicillium, Aspergillus u. s. w.), wenn sie in reichlicher Entwickelung auf dem Malze getroffen werden, den stärksten Einfluss auf das Produkt zuschreiben muss, ob es nicht vielmehr eher ihre zahlreichen Begleiter sind, welche hier die wesentlichste Rolle spielen.

An der Oberfläche von Stückchen gepresster Hefe fand ich oft einen feinen weissen Belag, welcher am häufigsten aus einem Schimmelmycelium bestand, namentlich zu Chalara- und Dematiumähnlichen Formen gehörend. Es ist wohl möglich, dass diese Pflanzen, wenn sie eine dichtere Schicht an der Oberfläche der Hefenmasse bilden, durch ihre Atmung einen Teil des freien Sauerstoffs zurückhalten, welcher für die ruhende Hefen-

masse notwendig ist, um sich längere Zeit lebendig erhalten zu können. Auch hier traf ich immer ohne Ausnahme Bakterienbildungen.

Das Wesentliche ist also nach den in der Praxis gemachten Erfahrungen, dass eine Schimmelbildung beinahe immer als Indikator dafür dienen kann, dass andere zweifellos schädlichere und kräftiger eingreifende Organismen in der Entwickelung begriffen sind. Es ist daher von grosser Bedeutung, dass die Wände in den Gärungsräumen glatt sind: dies erreicht man am sichersten durch die jetzt schon häufig in Anwendung gebrachte Emaillefarbe.

Das Folgende enthält eine Übersicht über die wichtigsten Schimmelformen, welche für die Gärungsindustrie von Interesse sind.

### 1. **Botrytis cinerea** (Fig. 14)

bildet kleine graugelbe Rasen auf feuchten, hinsterbenden Pflanzenteilen und tritt ebenfalls auf der Würze auf. Vom graulich braunen Mycelium heben sich als senkrechte, gegliederte Fäden, gewöhnlich büschelig gestellt, die Konidienträger. Sie wachsen bis zur Länge von 1 *mm* heran, wonach die oberste Gliederzelle nahe ihrer Spitze 2—6 fast rechtwinkelig abstehende Ästchen treibt (*C''*). Die untersten dieser Ästchen sind die längsten; sie treiben unter ihrem Ende wiederum ein bis wenige kurze Seitenzweiglein. Die obersten Äste sind nahezu ebenso breit wie lang. Es entsteht somit ein System von Zweigen, welches einer Blütenrispe oder Weintraube ähnlich gestaltet ist. Nach beendetem Längenwachstume trennen die Äste ihren Innenraum durch eine Querwand dicht bei dem Hauptstamme von diesem ab. Gleichzeitig schwillt das Ende der Zweige und des Hauptstammes blasig an, und auf der oberen Hälfte jeder Anschwellung treten jetzt neben einander mehrere feine Ausstülpungen hervor, die rasch zu ovalen, plasmaerfüllten Bläschen anwachsen, welche an ihrer Basis stielartig verschmälert sind. Bei völliger Entwickelung dieser Konidien (*C'*) sind die Wände der tragenden Äste eingeschrumpft, und die Konidien werden dadurch einander so viel genähert, dass sie eine lockere, unregelmässige Anhäufung bilden, welche leicht abfällt. Bringt man diese Traube in Wasser, so

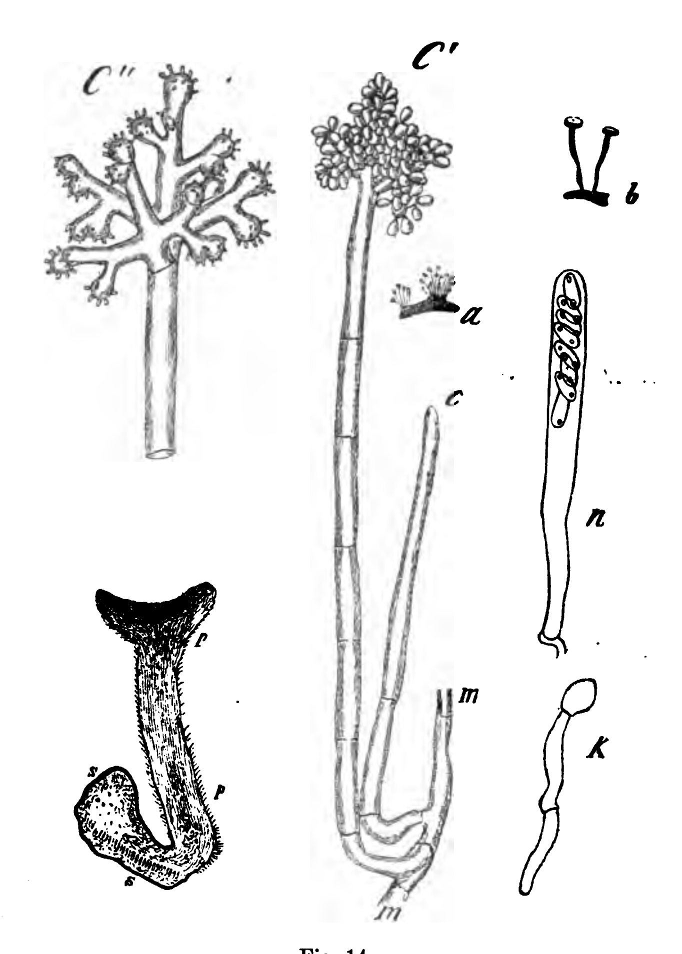



Fig. 14.

Botrytis cinerea, nach De Bary.

*a*, *b* (natürliche Grösse) Sclerotien, aus den bei *a* Konidienträger, bei *b* Schlauchfrüchte hervorwachsen; *c*, *C'* Konidienträger (*C'* mit eben reifen Konidien), von dem Myceliumfaden *m* entspringend (Vergrösserung etwa 200); *C''* Ende eines Konidienträgers mit dem ersten Beginn der Konidienabschnürung auf den Zweigenden; *k* keimende Konidie (Vergr. 300); *p*, *s* (schwach vergr.) Durchschnitt eines Sclerotiums *s*, aus welchem ein sehr kleiner Schlauchträger (*p*, *p*) hervorwächst; *n* (Vergr. 300) einzelner Sporenschlauch mit 8 reifen Sporen.

lösen sich die Konidien von ihren Stielen, die plasmaleeren Häute der Äste schrumpfen ein oder sind nur spurenweise zu finden; ihre früheren Ansatzstellen am Hauptfaden treten nur als schwach gewölbte Narben hervor. Das nächstobere Glied kann jetzt das zusammengeschrumpfte Endglied zur Seite schieben, in die Höhe wachsen und eine neue Rispe bilden; dies kann sich mehrere Male wiederholen, wodurch der Konidienträger eine beträchtliche Länge erreicht.

Unter gewissen Verhältnissen geht diese Schimmelpflanze in ein eigentümliches Ruhestadium, das sogenannte Sclerotium (scleros = hart) über (*a*, *b*, *ss*). Die Mycelfäden verästeln sich überaus reich, und die Äste verflechten sich zu einem lückenlosen Körper von verschiedener Gestalt, kreisrund bis schmal spindelförmig und von wechselnder Grösse, bis zu ein paar Linien; die äussersten Fadenenden werden braun bis schwarz, und das reife, feste Sclerotium besteht so aus einer äusseren, schwarzen Rinde und einem inneren farblosen Gewebe. Solche Körper sind nach einem — mindestens 1 Jahr — langen Ruhezustande dazu fähig, eine neue Vegetation zu bilden und können insofern mit den Knollen und Wurzelstöcken der höheren Pflanzen verglichen werden. Bringt man das Sclerotium bald nach der Reife auf feuchten Boden, so brechen die inneren farblosen Zweige durch die schwarze Rinde und heben sich als Konidienträger empor (*a*). Bringt man dagegen die Sclerotien erst nach längerer Ruhe auf feuchte Unterlage, so entwickelt sich aus dem inneren Gewebe ein starkes Büschel von Fäden, welche senkrecht emporwachsen, um sich schliesslich zu einer flach tellerförmigen Scheibe auszubreiten (*b*, *ps*); auf der freien oberen Fläche der Scheibe stellen sich die Fadenenden parallel; einige derselben bleiben dünn, andere schwellen zu keulenförmigen Schläuchen heran, und jeder dieser Schläuche bildet in seinem Innern acht ovale Sporen (*n*). Der Pilz ist jetzt ins Schlauchfruchtstadium eingetreten. Die Sporen keimen nach dem Freiwerden, und die Keimfäden wachsen zu Konidienträgern aus.

Nach BERSCH, FITZ und REESS wird diese Pflanze als Ursache einer der Krankheiten des Weines angenommen, welche sich als ein unangenehmer rauchähnlicher Geschmack und Geruch äussert. Ähnliche Krankheitsfälle wurden vereinzelt in der Bier-

brauerei getroffen; es ist jedoch zweifelhaft, ob sie von diesem Pilze herrühren.

## 2. **Penicillium glaucum** (Fig. 15).

Ein Schimmelpilz, welcher sich einer weit grösseren Verbreitung in den Gärungsgewerben erfreut, namentlich auf dem

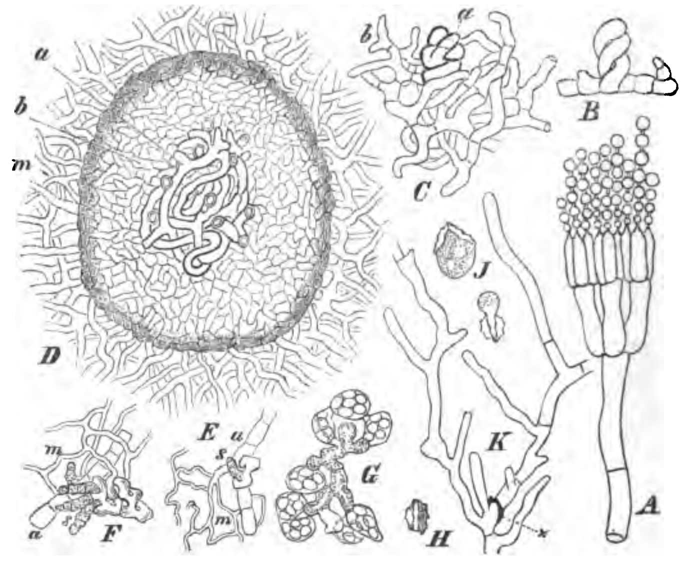



Fig. 15.

Penicillium glaucum nach Brefeld.

*A* Konidienträger, *B* Geschlechtsorgane, *C* Anlage des Fruchtkörpers (*a* das sich weiter entwickelnde Carpogon, *b* sterile Fäden); *D* sehr junger Fruchtkörper im Querschnitt (*a* ascogene Hyphen, *b* steriler Teil des Fruchtkörpers, *m* Mycelium); *E* und *F* ascogene Hyphen (*a*) mit jungen Schlauchanlagen (*s*) und sterilen mycelartigen Fäden (*m*) aus einem weiter entwickelten Fruchtkörper; *G* Gruppe von Schläuchen mit Sporen; *H* Spore, *I* keimende Sporen, *K* junges Mycelium (bei *x* die Spore).

Grünmalze, ist Penicillium glaucum. Er bildet einen zuerst weissen, dann grünlich- oder bläulich-grauen Filz auf dem Substrate und verbreitet sich mit grosser Schnelligkeit. Das Mycel besteht aus klaren, verästelten und geteilten Fäden, welche, wenn sie in Flüssigkeiten untergetaucht sind, etwas unregelmässig anschwellen

können. Von diesen Fäden heben sich die Konidienträger (*A*) senkrecht in die Höhe. Sie bestehen aus gestreckt-cylindrischen Zellen, von welchen die Endzelle bald ihr Längenwachstum sistiert und sich pfriemenförmig zuspitzt; die nächstuntere Zelle treibt ein oder mehrere gegenüberstehende Zweiglein, die sich dicht neben der Endzelle aufrichten und gleich dieser aus einer pfriemenförmigen Zelle bestehen. Bei stärkeren Exemplaren können sich die Äste verzweigen (vergl. Fig. 15*A*) oder es entspringen auch von den folgenden Zellen ähnliche Äste, welche sich wie angegeben verzweigen und zuspitzen. In diesem Büschel von Ästen schnürt nun jede zugespitzte Zelle (Sterigma) eine Reihe von kugeligen Konidien ab, und schliesslich trägt dann das Büschel einen ganzen Haufen von reihenweise gestellten Konidien, welche, wenn sie reif sind, leicht zerstäuben. Diese runden, glatten Konidien verleihen dem Schimmelrasen die genannte graublaue Farbe; sie können, wenn sie auf feuchte Substrate geraten, sofort keimen. — Bei Kulturversuchen mit diesem Pilze machte BREFELD die interessante Beobachtung, dass Penicillium unter gewissen Verhältnissen mit einer ganz anderen Entwickelungsform auftreten kann: Er schloss Kulturen des Schimmelpilzes auf Scheiben groben, ungesäuerten Brotes zwischen Glasplatten ein und liess die Kultur unter möglichstem Abschluss der atmosphärischen Luft sich weiter entwickeln. Es treten dann auf dem Mycel paarweise kurze dicke Äste auf, welche einander umschlingen (*B*); der eine Teil dieser Schrauben fängt an, kurze Schläuche hervorzutreiben (*C*), während der die Schraube tragende Mycelfaden zahlreiche feine Äste hervorbringt, welche die Schraube einhüllen und eine Decke bilden (*D*), die eine innere festere und eine äussere filzartige Schicht besitzt; nach und nach werden die inneren Zellen gelb gefärbt und die äusseren lockeren Zellen werden abgestossen. In dieser kleinen gelben Kugel findet nun nach und nach durch fortschreitende Verzweigung der obengenannten Schraubenäste eine Bildung von angeschwollenen Zellen statt (*E*, *F*, *G*), in welchen je 8 Sporen entstehen. Diese sind dick linsenförmig, auf der Kante mit einer Ringfurche und auf der äusseren Membran (Exosporium) mit drei bis vier schwachen Rippen versehen. Nach Zusammenfallen und Auflösung aller übrigen inneren Elemente werden endlich die Sporen frei, und

die kleine eigelbe Kugel ist jetzt mit dem Sporenpulver gefüllt. Diese ganze Entwickelung dauert 6—8 Wochen. Die Sporenfrüchte können trocken mehrere Jahre aufbewahrt werden, ohne ihre Keimfähigkeit einzubüssen. Sät man die Sporen (*H*) aus, dann springt das Exosporium in der Ringfurche klappenförmig auf und das Endosporium tritt blasig hervor (*I*), sich zu einem Keimschlauche verlängernd, welcher alsbald die Konidienträger hervorbringt.

Penicillium besitzt die Fähigkeit, ein invertierendes Ferment auszuscheiden, welches den Rohrzucker in andere Zuckerarten umzubilden vermag.

### 3. **Eurotium Aspergillus glaucus** (Fig. 16).

Die Entwickelung dieses Pilzes wurde zuerst vollständig von dem berühmten DE BARY beschrieben. Er bildet einen feinen filzigen, gräulichen oder graugrünen Überzug an den verschiedensten Stoffen und kann in ausserordentlicher Üppigkeit auf dem Grünmalze auftreten.

Das Mycelium besteht, wie bei Penicillium, aus feinen, glashellen und verzweigten Fäden, mit Scheidewänden versehen. Einige der Hyphenfäden heben sich senkrecht in die Höhe, sind dicker als die übrigen und nur ausnahmsweise verzweigt, oder durch Querwände geteilt. Ihr oberes Ende schwillt zu einem kugeligen Kolben (*c*) an, und dieser treibt auf seiner ganzen oberen Hälfte stralig divergierende Ausstülpungen von länglicher Form; diese Sterigmen (*s*) treiben dann auf ihrer Spitze kleine rundliche Ausstülpungen, die mit stark verschmälerter Basis dem Sterigma aufsitzen, und sich nach einiger Zeit als selbstständige Zellen (Sporen oder Konidien) von den Sterigmen abgrenzen. Unter dem Ansatze der ersten Spore entsteht aus dem Scheitel des Sterigmas eine zweite, welche die erste emporhebt, danach eine dritte u. s. w. Jedes Sterigma trägt so eine Kette von Sporen, von welchen die jüngsten dem Sterigma am nächsten sitzen. Dies geschieht gleichzeitig über der ganzen Fläche des angeschwollenen Endes des Konidienträgers, welches dann schliesslich von einem dichten Kopfe strahlig geordneter Sporenketten bedeckt ist; diese Sporenmasse bildet den graugrünen Staub,

welcher die Hyphenmasse überkleidet. Schliesslich trennen sich sind die Konidien von einander; sie dann an ihrer äussersten Fläche fein warzig. Diese kleinen Körper können nach ihrer Abtrennung sofort keimen (*p*) und entwickeln alsbald einen neuen Schimmelpilz — hierauf beruht die Schnelligkeit, womit diese Pflanze sich verbreitet. Unter Verhältnissen, welche noch nicht genau bekannt sind, die jedoch jedenfalls eine reichliche Ernährung vorauszusetzen scheinen, entwickelt der Pilz Sporenfrüchte. Sie beginnen als zarte Zweiglein, welche nach beendetem Längenwachstume ihr Ende wie einen Korkzieher in 4—6 Windungen zu krümmen beginnen (*f*); die Windungen werden nach und nach weniger steil, bis sie schliesslich einander berühren, so dass das ganze Ende des Pilzfadens die Form einer Schraubenlinie angenommen hat (das Carpogon). Es wachsen danach von der untersten Windung der Schraube zwei oder mehrere kleine Zweige empor, welche der Schraube fest angeschmiegt sind. Das eine dieser Zweiglein (*S*, *T*, *p*), das sogenannte Pollinodium, eilt dem andern im Wachstum voraus, erreicht mit seinem oberen Ende rasch den obersten Teil der Schraube und verschmilzt sich mit ihm. Das oder die anderen Zweiglein wachsen gleichfalls längs der Schraube empor, verzweigen sich und schieben sich neben und zwischen einander, bis sie endlich als eine lückenlose Hülle die Schraube umgeben (*W*). Diese Zweige teilen sich durch zur Oberfläche senkrechte Wände, und die Hülle besteht somit aus kurzen, eckigen Zellen, worin neue Wände, parallel zur Oberfläche, entstehen, so dass die Hülle mehrschichtig und dicker wird (*V*, *X*, *F*). Die jetzt gebildete kleine Kugel ist etwa $^1/_4$ *mm* gross, die äusserste Schicht wird gelb, die inneren Schichten bleiben zart und gehen später zu Grunde. Die Schraube streckt sich endlich und treibt nach allen Seiten verästelte Zweige, welche die inneren Schichten der Hülle verdrängen; diese Zweige nehmen endlich Schlauchform an (*M* und *A*), und in jedem bilden sich acht Sporen. Nach dem Zerfalle der Sporenschläuche liegen die Sporen lose im Innern der Frucht und gelangen durch die Risse der zuletzt brüchig werdenden Wand ins Freie. Die Sporen sind wie bei Penicillium biconvex, warzig und besitzen eine äussere, derbe Membran und eine innere, welche beim Keimen die äussere in zwei Klappen auseinander treibt (*r*).

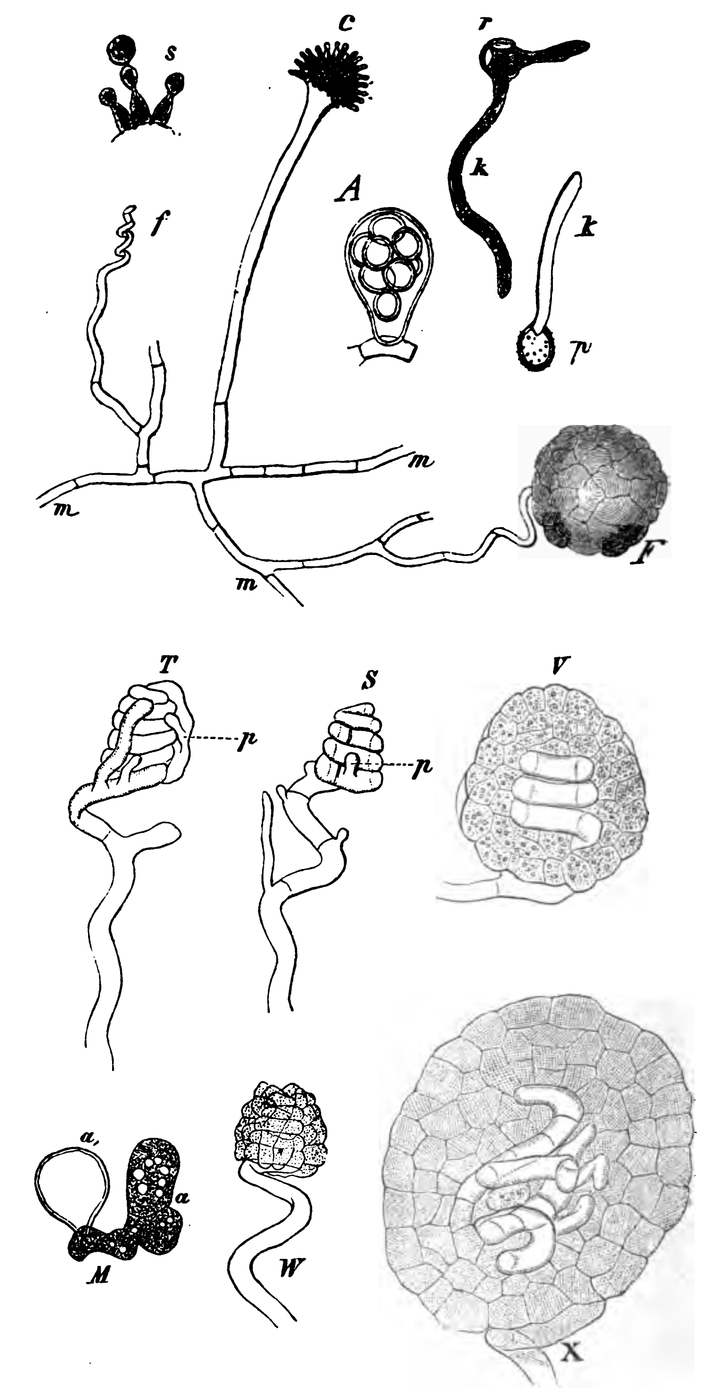



Fig. 16. Eurotium Aspergillus glaucus nach de Bary.

Beschreibung zu Fig. 16.

*m m* Myceliumfaden, einen Konidienträger *c* (von dem die Konidien abgefallen), eine Schlauchfrucht *F* und die erste Anlage eines Carpogons *f* tragend (Vergrösserung 190fach); *s* drei Sterigmen vom Scheitel eines Konidienträgers, die Konidienabschnürung zeigend; *p* keimende Konidie (Vergr. 250—300); *A* Sporenschlauch, *r* keimende Schlauchspore, *k* Keimschläuche; *S* schraubiges Carpogon, bei *p* die Entwickelung des emporwachsenden Pollinodiums beginnend: *T* älterer Zustand; *W* Carpogon, von der Hülle fertig umwachsen; *V* Längsdurchschnitt eines älteren Zustandes, in der Mitte das Carpogon, ringsum die mehrschichtig gewordene Hülle; *X* Längsdurchschnitt eines weiteren Entwickelungszustandes des Carpogons, von vielschichtiger Hülle umgeben, hat seine Windungen gelockert und beginnt die ascusbildenden Zweige zu treiben; *M* Stück eines älteren ascustragenden Zweiges, *a* ein junger, $a_1$ ein älterer zerplatzter Ascus.

Ausser dieser Art treten in der Natur verschiedene andere, nahe verwandte auf und finden auch zu den hier besprochenen Lokalitäten ihren Weg. Bei dem grössten Teile dieser Arten kennt man nur das Konidienstadium.

### 4. Aspergillus Oryzae.

Zur Darstellung des japanischen stark vergorenen Reisweines (Saké) wird der sogenannte Aspergillus Oryzae, über welchen AHLBURG, ATKINSON, COHN und BÜSGEN Mitteilungen gegeben haben, planmässig verwendet. Die von den Hülsen befreiten Reiskörner werden gedämpft, doch wird ein Zusammenballen und Verkleistern der Körner vermieden. Um nun aus diesen nicht keimfähigen Körnern, bei welchen folglich die gewöhnliche Diastasewirkung ausgeschlossen ist, ein für das Brauen dienliches Malz darzustellen, vermischt man die Körnermasse mit dem sogenannten „Tane kosi“ — Reiskörner, welche mit dem Mycel und den Fruchtträgern des Aspergillus Oryzae eingesponnen und überzogen sind. In der feuchten und warmen Luft entwickelt sich nach ca. 3 Tagen auf dem Reis ein weisses, sammetartiges Mycel, welches der Masse einen angenehmen Geruch von Äpfeln oder Ananas verleiht. Ehe die Fruktifikation des Pilzes eintritt, fügt man neue Massen von gedämpftem Reis hinzu, welche wieder vom Mycel umsponnen werden und wiederholt dies mehrere Male. Ein wässeriger Auszug der jetzt erzeugten Koji-Masse zeigt, dass

ein Teil der Stärke in Glykose und Dextrin verwandelt ist, und dass einige der früher in Wasser unauflösbaren Albuminstoffe lösbar gemacht sind. Insofern der genannte Aspergillus der einzig wirkende Faktor ist, hat er verschiedene, auch diastatisch wirkende Fermente ausgeschieden; ein wässeriger Auszug des Schimmelmycels zeigt faktisch diastatische Eigenschaften. Die Kojimasse wird gemaischt, indem man 21 Teile Koji und 68 Teile Reis bei Dampf gekocht mit 72 Teilen Wasser vermischt. Diese breiartige Masse wird sich selbst überlassen, bei ca. 20° nach wenigen Tagen klar, die Verzuckerung der Stärke und Dextrinen schreitet immer weiter fort, und gleichzeitig tritt eine spontane, sehr heftige Gärung ein, durch einen hefenartigen Pilz bewirkt, welcher mit dem Aspergillus nicht in genetischer Verbindung steht und nicht genauer bekannt ist. Nach 2 bis 3 Wochen ist die Gärung beendet, und das Produkt ist eine gelbe, blanke, Sherryähnliche Flüssigkeit mit einem Gehalte von 13—14 pCt. Alkohol.

### 5. Mucor.

Das Genus Mucor gehört zu den interessantesten der Gruppen von Schimmelpilzen, welche uns hier beschäftigen, indem es Formen mit stark ausgeprägten Fermentwirkungen enthält. Sie treten als ein grauer oder brauner Filz von bisweilen ganz bedeutender — mehrere Zoll — Höhe auf, in welchem das blosse Auge feine gelbe, braune oder schwarze Kügelchen unterscheidet.

Wir geben eine Beschreibung der häufigst vorkommenden Arten.

Mucor Mucedo (Fig. 17), eine der prachtvollsten Schimmelformen, welche z. B. auf dem Miste pflanzenfressender Tiere sehr allgemein auftritt, hat ein glashelles, weisses Mycelium, welches sich auf und in der Unterlage stark und fein verästelt und in den ersten Entwickelungsstadien, bis zum Eintritt der Sporangienbildung, ohne Scheidewände, also einzellig ist. Von diesem Mycelium heben sich einfache, kräftige Äste empor, die Sporangienträger; die Spitzen dieser Äste schwellen stark, und unter der Anschwellung wird endlich eine Scheidewand gebildet, wodurch

das Sporangium vom Sporangienträger abgegrenzt ist. Die Scheidewand wölbt sich nach oben und bildet ein „Säulchen“ (columella) im Innern der kugelförmigen Anschwellung, wodurch ein Innenraum von eigentümlicher Form (1) entsteht. Das Protoplasma dieses Raumes zerfällt in eine Menge kleiner Portionen, die sich mit einer Haut umgeben und sich abrunden; das sind die Sporen. Gleichzeitig wird diese Sporenfrucht an ihrer Aussenseite mit feinen, nadelförmigen Krystallen oxalsauren Kalkes bekleidet. Sobald die reife, braune Sporenfrucht Feuchtigkeit aufnimmt, wird die Wand aufgelöst, und die Sporen werden nach allen Seiten hin mit dem schwellenden Inhalte des Sporangiums zerstreut. Am Ende der Fruchthyphe sitzt noch das „Säulchen“, welches sich in der Frucht emporhob; dieses ist jetzt unten von einem Kragen umgeben, dem Reste der Fruchtwand (2). Die lichtbrechenden Sporen schwellen, wenn sie in geeignetes Substrat fallen, sehr stark an und senden einen oder zwei Keimfäden (3, 4), aus, welche schnell ein kräftiges Mycelium entwickeln.

Ausser dieser Art von Vermehrung besitzen Mucor Mucedo und die übrigen Species noch eine andere, geschlechtliche Vermehrung, welche mittels einer „Kopulation“ zweier Äste desselben Myceliums vor sich geht. Zwei solche gegen einander wachsende kurze Zweige schwellen keulenförmig an und berühren sich mit ihren äussersten Enden (5). Die Zweige werden dann durch je eine Querwand in zwei Zellen geteilt, und die sich berührenden Endzellen verschmelzen durch Auflösung der sie trennenden, ursprünglich doppelten Wand. Diese zwei kopulierenden Zellen sind entweder einander gleich an Grösse, wie hier bei Mucor Mucedo, oder sie sind einander ziemlich konstant ungleich, wie bei Mucor stolonifer. Die so neugebildete Zelle — Zygospore (6) — nimmt schnell an Grösse zu und schwillt an zur Form einer Kugel (bei Mucor stolonifer einer Tonne), wonach die Wand verdickt und geschichtet wird: äusserlich ist sie dunkel gefärbt und mit warzigen Hervorragungen versehen. Diese äusseren Schichten sind sehr widerstandsfähig gegen Angriffe von Säuren. Die Zygosporen können meist erst nach längerer Ruhezeit keimen; der durch die äusseren Schichten getriebene Keimschlauch entwickelt sofort die beschriebenen Sporenfrüchte (7). — In der Zygospore treffen wir so ein Ruhestadium der Pflanze, ein Organ,

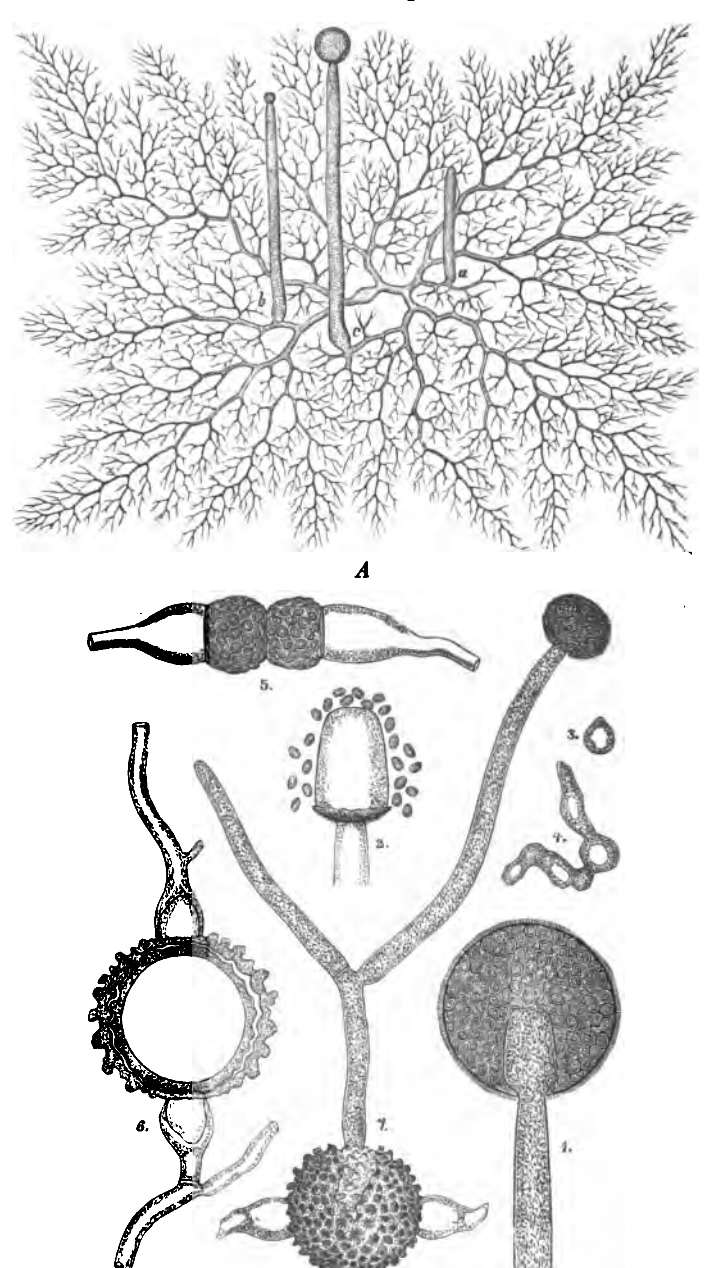



Fig. 17. Mucor Mucedo nach BREFELD und KNY.

Beschreibung zu Fig. 17.

*A* baumartig verzweigtes Mycelium mit einzelnen dickeren aufrechten Äste (*a*, *b*, *c*). 1 Sporangium, 2 Columella und Sporen, 3, 4 keimende Sporen, 5, 6 Entwickelung der Zygospore, 7 keimende Zygospore mit Sporangium.

welches durch seinen Bau den Pilz in den Stand setzt, das Leben in Perioden, welche für die Entwickelung ungünstig sind, zu bewahren.

Mucor racemosus hat einen verzweigten, mehrzelligen Sporangienträger, welcher ebenfalls eine bedeutende Höhe erreichen kann. An den Enden der Zweige entwickeln sich die graugelben Sporenfrüchte. Wenn man diesen Pilz auf Würze kultiviert, schwillt das untergetauchte Mycelium unregelmässig an, es treten sehr viele Scheidewände auf, welche grosse tonnenförmige oder unregelmässige mit stark lichtbrechendem Plasma gefüllte Zellen abgrenzen. Diese Zellen — Gemmen — werden leicht isoliert, nehmen dann — wie zuerst von BAIL beobachtet — Kugelform an (vergl. Fig. 18, 7) und vermehren sich hiernach durch Sprossung wie die eigentlichen Hefenpilze; dasselbe geschieht mit den untergetauchten Sporen (Mucorhefe, Kugelhefe). Ähnliche Gemmenbildungen können entstehen, wenn der Pilz auf festem Substrate kultiviert wird.

Mucor erectus tritt z. B. auf faulen Kartoffeln auf und hat mikroskopisch ganz denselben Bau wie M. racemosus, unterscheidet sich jedoch physiologisch von diesem (siehe unten).

Mucor circinelloides (Fig. 18) hat ein recht charakteristisches Aussehen. Das Mycel (1) zeigt eine eigentümliche Verzweigung, welche bei einigen der Mucorarten auftritt: Die Hauptzweige senden kurze, wiederholt gabelig geteilte, wurzelähnliche Seitenzweige aus; vom Grunde dieser wachsen neue Mycelzweige aus, welche sich emporheben und Sporangien bilden können (2—5); der Sporangienträger ist verästelt. Während seiner Entwickelung gehen starke Krümmungen vor sich, denen er den Namen circinelloides verdankt. Sowohl bei dieser Form als bei Mucor spinosus — dessen chokoladenbraune Sporangien sich dadurch auszeichnen, dass die Columella in ihrem obersten Teile mit spitzen, dornenähnlichen Auswüchsen besetzt ist — bringt das in einer zuckerhaltigen Flüssigkeit untergetauchte Myce-

lium die gleichen Gemmenbildungen hervor wie bei Mucor racemosus und M. erectus.

Mucor stolonifer (Rhizopus nigricans) erreicht eine recht ansehnliche Grösse und tritt sehr allgemein, z. B. auf saftigen Früchten, auf. Man erkennt diesen Pilz leicht daran, dass das braungelbe Mycelium dicke, querwandlose Schläuche schräg

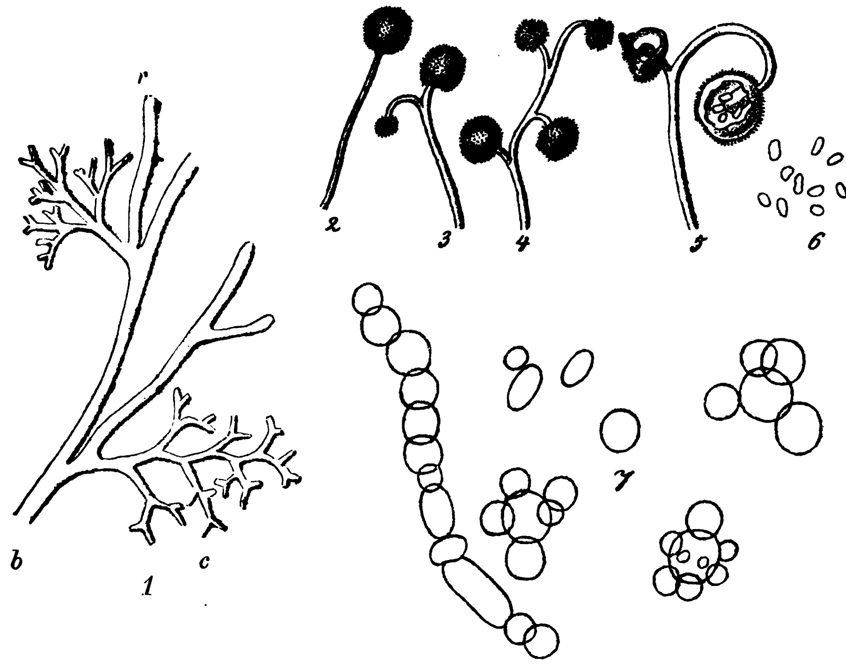



Fig. 18.
Mucor circinelloides nach VAN TIEGHEM und GAYON.
1 Mycelium: *b* Hauptzweig, *c* wurzelartige Zweige, *r* axilläre Zweige; 2 bis 4 Entwickelung von Sporangien; 5 geöffnete Sporangien; 6 Sporen; 7 untergetauchtes Mycelium und sprossende Zellen.

in die Luft emporsendet; diese nehmen eine Länge von ca. 1 *cm* an, senken darauf ihre Spitze zur Unterlage und senden feine, reich verzweigte Schläuche wie Wurzeläste ins Substrat hinein, während andere Schläuche sich senkrecht emporheben und Sporangien entwickeln; wieder andere Äste bilden neue Ausläufer.

Die schwarze Sporenfrucht besitzt ein hohes, kuppelförmiges „Säulchen“ und entwickelt eine Menge dunkelbrauner, runder oder eckiger Sporen. Wenn diese nach Auflösung der Fruchtwand frei geworden sind, wird die Columella wie ein Regenschirm auf den Fruchtträger umgestülpt, an dem die Ansatzlinie der Aussenwand in Form einer Ringleiste angedeutet bleibt.

Die Mucorarten haben von unserem Standpunkte aus gesehen ein ganz besonderes Interesse dadurch, dass die Arten in verschiedenem Grade als eigentliche Alkoholfermente auftreten können. Wie oben beschrieben, werden einige Mucorarten, in eine zuckerhaltige, vergärbare Flüssigkeit getaucht, das Aussehen schnell ändern; während der Pilz so in seinem Äussern an die hefenartigen Pilze erinnert, führt er gleichzeitig eine wirkliche Alkoholgärung aus, indem er als die wichtigsten Gärungsprodukte Alkohol und Kohlensäure hervorbringt. Werden dann die genannten freien Glieder des Pilzes mit den Kohlensäurebläschen zur Oberfläche der Flüssigkeit gehoben, können sie wieder die Schimmelform entwickeln. Diese Fähigkeit, eine Alkoholgärung hervorzubringen, besitzen die meisten Species von Mucor, aber in verschiedenem Grade; doch ist die Fermentfähigkeit nicht ausschliesslich an die genannten sprossenden Gemmenbildungen geknüpft, denn solche wurden bei Mucor Mucedo und stolonifer nicht beobachtet.

Nach den neuesten Untersuchungen HANSENs rufen die Arten, insofern sie überhaupt Alkoholgärungspilze sind, nicht nur in Dextrose- und Invertzuckerlösungen, sondern auch in denen von Maltose Gärung hervor; unter den von ihm untersuchten Arten vermag nur Mucor racemosus eine Rohrzuckerlösung zu invertieren; die übrigen können daher in dieser Zuckerlösung keine Gärung hervorbringen.

Mucor erectus besitzt die kräftigste Fermentfähigkeit. In Bierwürze von der gewöhnlichen Konzentration — 14—15° Ball. — giebt er bis zu 8 Vol.-pCt. Alkohol. Auch in Dextrinlösungen ruft er eine Alkoholgärung hervor und bildet Stärke zu reduzierendem Zucker um. Mucor spinosus gab in Bierwürze bis zu 5,5 Vol.-pCt. Alkohol; in Maltoselösung wurden deutliche Gärungsphänomene beobachtet, und nach 8 Monaten enthielt die Flüssigkeit 3,4 Vol.-pCt. Alkohol. Mucor Mucedo übt eine verhältnis-

mässig geringe Gärwirksamkeit aus, sowohl in Würze (bis ca. 3 Vol.-pCt. Alkohol) wie in Maltose und Dextrose. Mucor racemosus giebt in Würze bis 7 Vol.-pCt. Alkohol, entwickelt Invertin und vergärt den invertierten Rohrzucker; sie nimmt dadurch, wie oben berührt, eine Sonderstellung ein.

Nach GAYON verhält Mucor circinelloides sich dem Rohrzucker gegenüber unwirksam, während er im Invertzucker eine kräftige Fermentwirksamkeit ausübt (5,5 Vol.-pCt. Alkohol). Nachdem er diese Beobachtung gemacht hatte, so zog er hieraus den Schluss, dass dieser Pilz mit Vorteil in den Zuckerfabriken benutzt werden könnte, um den Rohrzucker aus der Melasse auszuziehen. Soweit ich in Erfahrung bringen konnte, wurde seine Beobachtung doch bisher nicht in der Praxis verwendet

## 6. Monilia (Fig. 19).

Unter diesem Namen findet man in den mykologischen Werken eine Menge verschiedener Pilze verhältnismässig einfachen Baues beschrieben; von einem Mycelium, welches je nach der Art verschiedene Farbe besitzt, heben sich Äste empor, welche Reihen von eiförmigen oder elliptischen Sporen abschnüren. Das Genus erhielt in der neuesten Zeit Interesse dadurch, dass eine seiner Arten, welche HANSEN vorläufig Monilia candida nach BONORDENs Beschreibung genannt hat, ganz merkwürdige Eigenschaften in physiologischer Hinsicht zeigte. Sie tritt in der Natur als eine weisse Schicht auf frischem Kuhmiste und süssen saftigen Früchten auf. Führt man sie in Würze über, dann entwickelt sie eine reiche Vegetation hefenartiger Zellen, welche mit Saccharomyces ellipsoideus oder cerevisiae Ähnlichkeit haben. Gleichzeitig ruft sie eine kräftige Alkoholgärung hervor und bildet, während diese noch vor sich geht, eine mycodermaartige Haut auf der Flüssigkeit; die Zellen in dieser Haut strecken sich mehr und mehr und bilden endlich ein vollständiges Mycelium. In der ersten Periode bildete der Pilz, während Sacch. cerevisiae 6 Volumen-Prozent Alkohol gab, nur 1,1 pCt.; aber die Monilia setzte die Gärung fort, während die Kulturhefe bei dem genannten Quantum stehen blieb, und hatte im Laufe von 6 Monaten 5 Volumen-Prozent hervorgebracht.

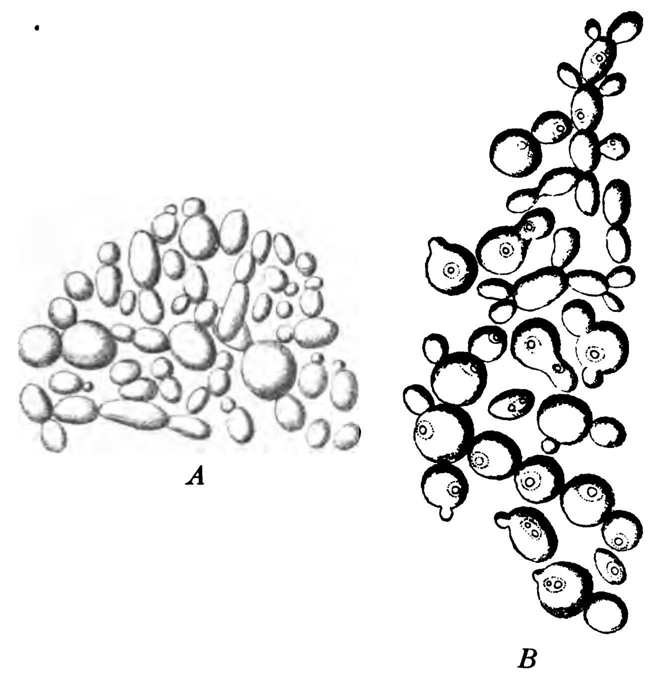



Fig. 19. Monilia candida nach Hansen.

*A* Vegetation in Bierwürze oder anderen zuckerhaltigen Nährflüssigkeiten. *B* Zellen einer jungen Hautbildung. *C* Schimmelvegetation. Formen wie *a* sind häufig; sie bestehen aus Ketten von langgestreckten, mehr oder weniger fadenförmigen Zellen, welche mit einander ziemlich lose verbunden sind; bei jeder Gliederung findet sich gewöhnlich ein Quirl ovaler Zellen, die leicht abfallen. In *b* ist eine andere, häufig vorkommende Form dargestellt, die sich aber von der erstgenannten dadurch unterscheidet, dass ihr die gequirlten Zellen fehlen; statt dieser wird gewöhnlich von jeder Gliederung ein Zweig derselben Form wie die Mutterzelle, aber kürzer hervorgebracht. Die Glieder in diesen Ketten sind nicht selten eng mit einander verbunden, die Einschnürungen verschwinden in vielen Fällen, und es entsteht ein ganz typisches Mycelium mit deutlichen Querscheidewänden (*c*). Die Formen *b* und *c* finden sich im Nährsubstrate, *a* gewöhnlich an der Oberfläche. Formen wie *d* haben mit Oïdium lactis viele Ähnlichkeit. In *e* sieht man eine Kette birnförmiger Zellen mit Quirlen von Hefezellen, welche mit Sacch. exiguus Ähnlichkeit haben. Die in *f* abgebildete Kette citronenförmiger Zellen stimmt genau mit Ehrenbergs Abbildung von Oidium fructigenum überein. Zwischen den beschriebenen Hauptformen findet man zahlreiche Hefezellen verschiedener Form und in Kolonieen mit verschiedener Gruppierung. Wie gewöhnlich treten dann auch Formen wie Sacch. conglomeratus Reess auf.

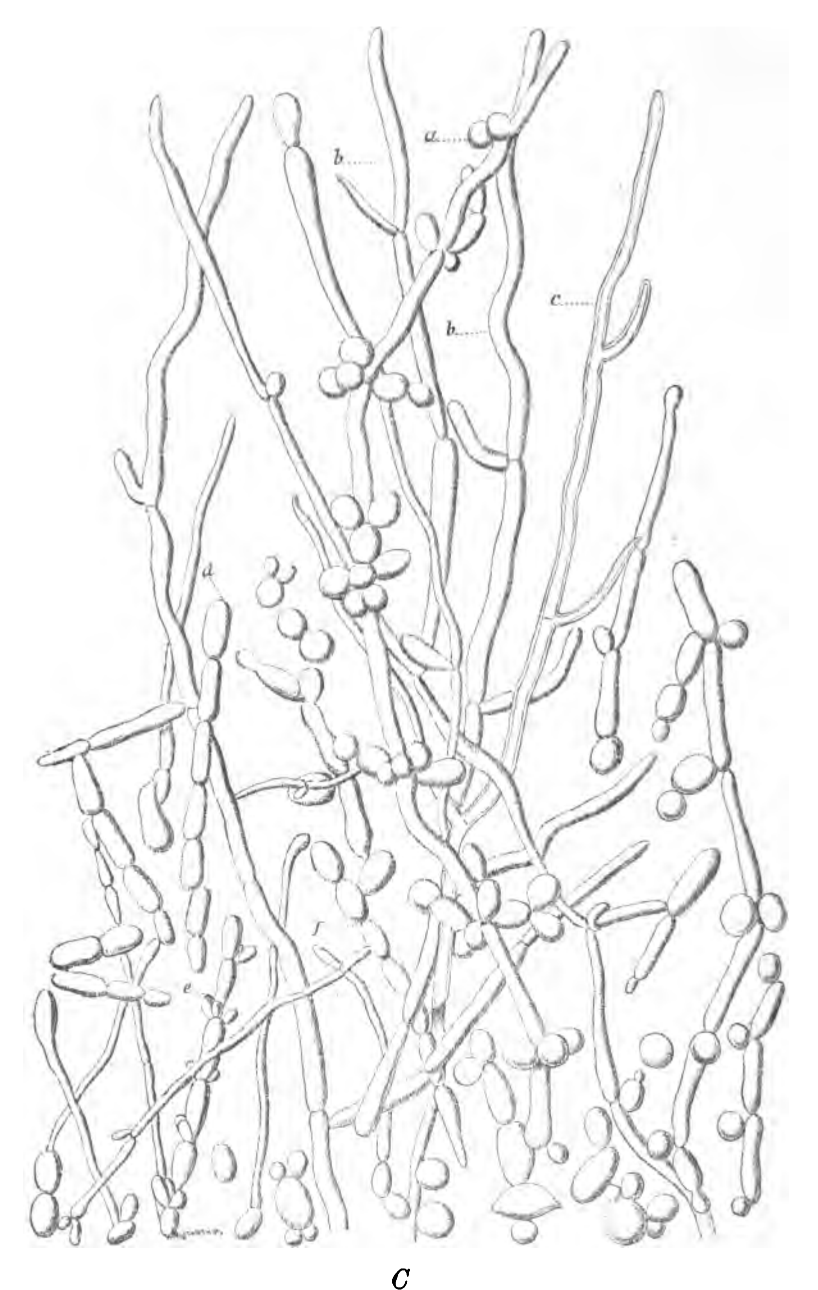



Fig. 19. Monilia candida nach HANSEN. Beschreibung siehe S. 77.

Die weiteren Versuche mit diesem Pilze führten zu dem auffälligen Resultate, dass er das chemisch lösliche Ferment, Invertin, nicht auszuscheiden vermag, und dennoch den Rohrzucker **als** Rohrzucker vergärt. Wie bekannt, wurde der Rohrzucker bisher als nicht direkt vergärbar charakterisiert; HANSEN hat somit dargethan, dass dieser Lehrsatz keine allgemeine Giltigkeit besitzt.

Es wurde ferner durch seine Untersuchungen dargethan, dass diese Art auch die Maltose vergärt. Da Monilia kein Invertin bildet und dennoch in Maltoselösungen eine Gärung hervorrufen kann, so geht hieraus hervor, dass eine vorherige Umwandlung von Maltose in Dextrose nicht nötig ist, um eine Vergärung dieser Zuckerart herbeizuführen.

Die Flüssigkeiten, welche die verschiedenen obengenannten Zuckerarten enthielten, zeigten während der Gärung einen Inhalt von Kohlensäure und Äthylalkohol.

Endlich soll noch erwähnt werden, dass dieser Pilz sich durch die Leichtigkeit auszeichnet, mit welcher er hohe Temperaturen aushält. In Bierwürze und Rohrzuckernährlösung entwickelt er sich bei 40° C. kräftig und ruft bei dieser Temperatur eine lebhafte Gärung hervor.

### 7. **Oidium lactis** (Fig. 20).

Ein Schimmelpilz, welcher in der gärungsphysiologischen und medizinischen Litteratur eine grosse Rolle gespielt hat, ist Oidium lactis, der sogenannte Milchsäurehefenpilz.

Ein Teil dieser Mitteilungen sucht darzulegen, dass er ein Entwickelungsglied von Arten sei, welche andererorts in ganz anderen Formen und mit ganz anderen Eigenschaften auftreten. Er wurde so in genetischen Zusammenhang mit Bakterien, Chalara (s. u.), Saccharomyces u. s. w. gebracht. BREFELD sowohl als HANSEN haben zahlreiche Untersuchungen mit diesem Pilze angestellt und Kulturversuche unternommen, welche lange Zeit hindurch fortgeführt wurden, ohne irgend eine andere als die gewöhnliche Oidiumform hervorzubringen. In der neuesten Zeit hat zwar BREFELD bei mehreren höheren Pilzen (Basidiomyceten) eine Konidienbildung, die in Oidienketten auftritt, nachgewiesen.

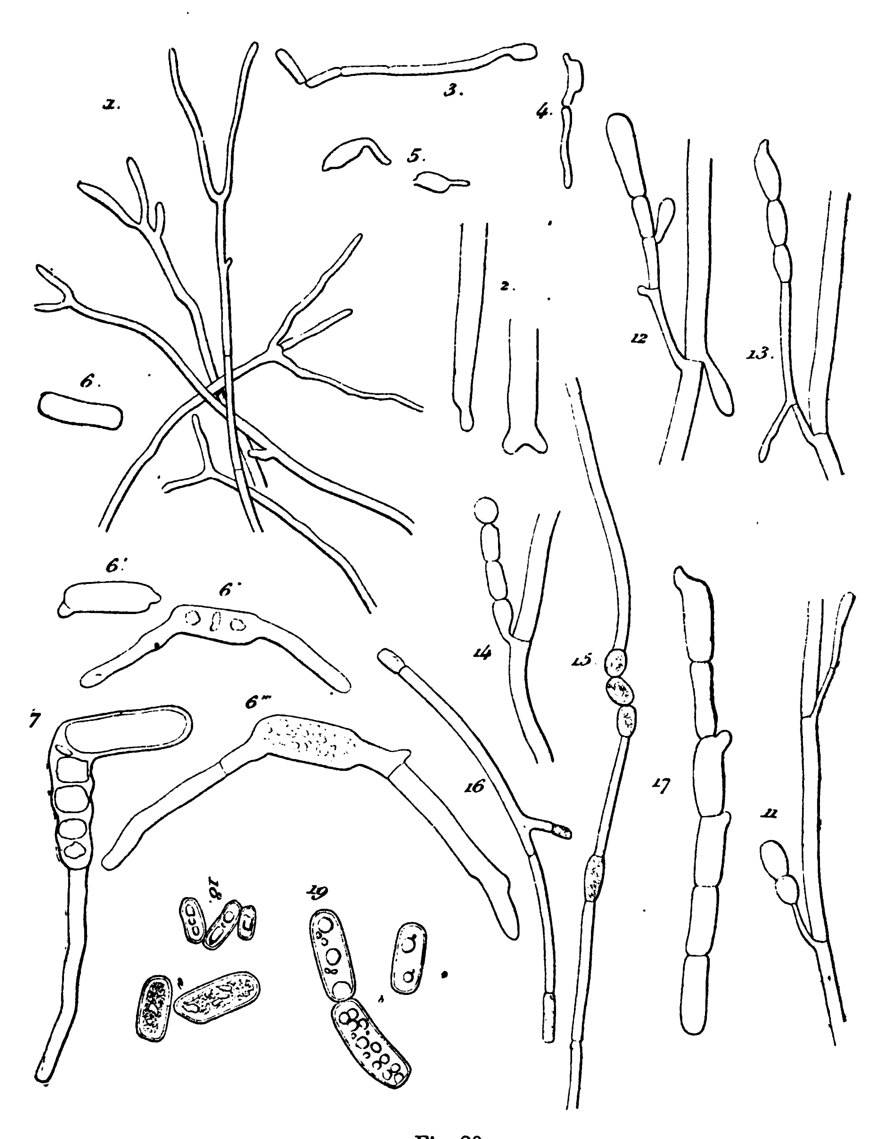



Fig. 20.

Oidium lactis nach Hansen.

## Beschreibung zu Fig. 20.

1 Hyphen mit Gabelteilungen. 2 zwei Hyphenspitzen, die eine mit Gabelteilung, die andere mit beginnender Abschnürung eines kugelförmigen Gliedes. 3—7 keimende Konidien; 6—6''' die Keimung einer Konidie, in gehopfter Bierwürze in RANVIERS Kammer ausgesät, durch mehrere Stadien dargestellt. An jedem Ende haben sich Keimfäden entwickelt; nach 9 Stunden (6''') haben die Keimfäden Querwände und die ersten Anlagen zu Verzweigungen gebildet. 11—14 abnorme Formen. 15, 16 Hyphen mit interstitiellen, von Plasma erfüllten Zellen. 17 keimende Konidienkette. 18 Konidien, welche in längerer Zeit in Zuckerlösung lagen; der Inhalt zeigt Öltropfen. 19 alte Konidien.

Ob nun darunter auch die Species, welche wir als Oidium lactis bezeichnen, inbegriffen ist, wurde aber bisher nicht festgestellt.

FRESENIUS gab dem Pilze mit Recht den Zunamen lactis (der Milch), denn alle Erfahrungen gehen darauf hinaus, dass er auf der Milch seinen gewöhnlichen Aufenthaltsort hat, wo er in den allermeisten Fällen gefunden werden kann. Es wurde dagegen gar kein Beweis dafür geführt, dass dieser Schimmelpilz im kausalen Verhältnisse zu den sauren Gärungen der Milch steht. Er tritt ferner spontan auf den verschiedensten anderen Flüssigkeiten auf, darunter auch auf den zuckerhaltigen Mischungen, welche in der Gärungsindustrie Verwendung finden, und kann hier eine schwache Alkoholgärung hervorrufen.

Die oft gabelig verästelten, dünnwandigen, glasklaren Hyphen (1) bilden einen hohen, weissen Filz; im obersten Teile der Fäden entstehen dicht neben einander Querwände, wonach die einzelnen mit einem stark lichtbrechenden Plasma erfüllten Zellen sich als Konidien (3—7, 11—14, 17—19) ablösen. Wenn der Pilz auf festem Substrate wächst, vereinigen sich die Hyphen und bilden eigentümliche kegelförmige Körper. In der Regel sind die Konidien im Längsschnitte rectangulär mit abgerundeten Ecken (3, 6, 17—19); man findet jedoch in einer Vegetation dieses Schimmelpilzes fast immer zugleich kugelige, ovale, birnenförmige und ganz unregelmässige Konidien (4, 5, 11—14). Diese einzig bekannten Vermehrungsorgane senden einen oder mehrere Keimfäden aus. Der Pilz kann auf Bier, namentlich alkoholarmem, auftreten. So wie die Alkoholmenge zunimmt, werden die Chancen für seine Entwickelung ungünstiger; doch sind weder die Würze noch das Bier der Gefahr ausgesetzt, in höherem Grade vom

Oidium angegriffen zu werden, da er den Kampf mit den Konkurrenten, welche sofort auftreten, wenn vergärbare Flüssigkeiten den Keimen der Luft sich darbieten, nicht aufzunehmen vermag.

Bei zahlreichen Untersuchungen der Oberhefe, namentlich wenn diese sich nach beendeter Gärung in ruhendem Zustande befindet, sah ich, dass dieser Pilz hier einen sehr günstigen Nährboden findet. Bisweilen zeigte die mikroskopische Untersuchung eine enorm grosse Menge seiner Konidien. Es ist nicht bekannt, welchen Einfluss eine solche Vegetation auf die Beschaffenheit der Hefe und des Bieres ausübt; zweifellos thut man gut daran, dem Pilze so weit wie möglich auszuweichen.

8. C. G. MATTHEWS beobachtete, dass die rote Farbe, welche auf Körnern des Malzes, namentlich wenn ihre Qualität weniger gut ist, auftritt, von einem Fusarium (am nächsten gramineārum) herrührt. Er kultivierte diesen Schimmel auf verschiedenen Substraten. Die büschelförmig gestellten Sporen sind spindelförmig, gekrümmt, ein- oder mehrzellig; sie sind farblos oder nur sehr schwach tingiert, waren aber in den Präparaten in einer stark gefärbten Masse eingebettet. MATTHEWS studierte die Keimung der Sporen und giebt an, dass dieser Schimmel, auf Würze kultiviert, an den untergetauchten Teilen geschwollene und kugelige Zellen wie Mucor hervorbringt, welche eine Gärung bewerkstelligen können. — Die Schimmelbildung beginnt am keimenden Ende des Kornes und breitet sich von dort mehr oder weniger über die Oberfläche aus. Wenn solche Körner überhaupt keimen, zeigen sie eine abnorme Entwickelung, indem sie entweder nur einzelne krankhaft aussehende Wurzelfasern oder nur einen Blattkeim aussenden. Während Penicillium, Mucor, Aspergillus u. s. w. ihre Sporen leicht mit der Luft über den Malzhaufen ausbreiten, können, nach MATTHEWS, die vom Fusarium angegriffenen Körner nur die Nachbarkörner angreifen, wahrscheinlich weil diese Sporen ein grösseres Gewicht haben und dem erzeugenden Schimmelfaden fester adhärieren.

9. Chalara Mycoderma (Fig. 21) wird in PASTEURs Études sur la bière als einer der Bewohner der Weinbeeren hervorgehoben. Das Mycelium bildet auf Flüssigkeiten eine Kahmhaut und besteht aus verzweigten, ins graue fallenden Fäden, oft mit stark lichtbrechendem Plasma, welche an verschiedenen Punkten Konidien

ungleicher Form und Grösse abschnüren. CIENKOWSKI hat in seiner Abhandlung über die Pilze der Kahmhaut Chalara zuerst ausführlich beschrieben. HANSEN fand, dass dieser Pilz auf gewöhnlicher Würze und Lagerbier nicht gedeiht; werden diese Flüssigkeiten dagegen verdünnt, so entwickelt er sich leicht und bildet eine dicke, glänzende, klebrige und zähe Kahmhaut.

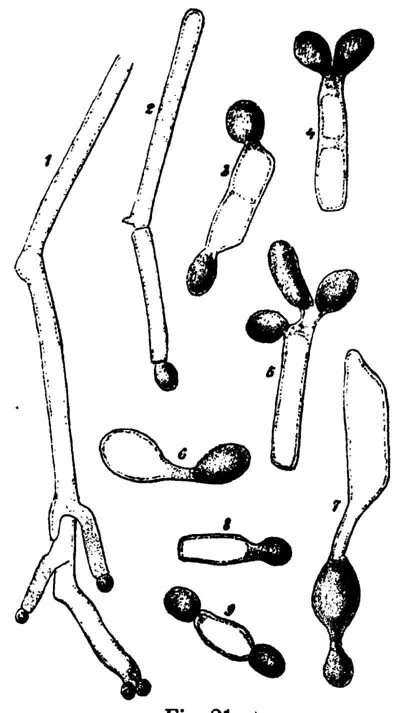



Fig. 21.
Chalara Mycoderma nach HANSEN.
1 eine verzweigte Hyphe, dessen Endglieder Konidien abschnüren; 2 eine Hyphe, an dessen oberer Zelle ein Sterigma, welches Konidien abgeschnürt hat; 3—9 Hyphenglieder verschiedener Form, welche Konidien abschnüren.

10. Ein Schimmelpilz, über welchem sehr viel in unserer Litteratur geschrieben wurde, dessen praktische Bedeutung dagegen sicherlich in umgekehrtem Verhältnisse zu der ihm gewidmeten Aufmerksamkeit steht, ist Dematium pullulans (Fig. 22),

welcher zuerst von DE BARY und später ausführlich von LOEW beschrieben wurde. Er tritt besonders auf Früchten, namentlich Weinbeeren, auf, hat ein verästeltes Mycelium, wovon Knospen abgeschnürt werden, welche mit gewöhnlichen Hefezellen eine auffallende Ähnlichkeit haben (4); diese können wieder in mehreren

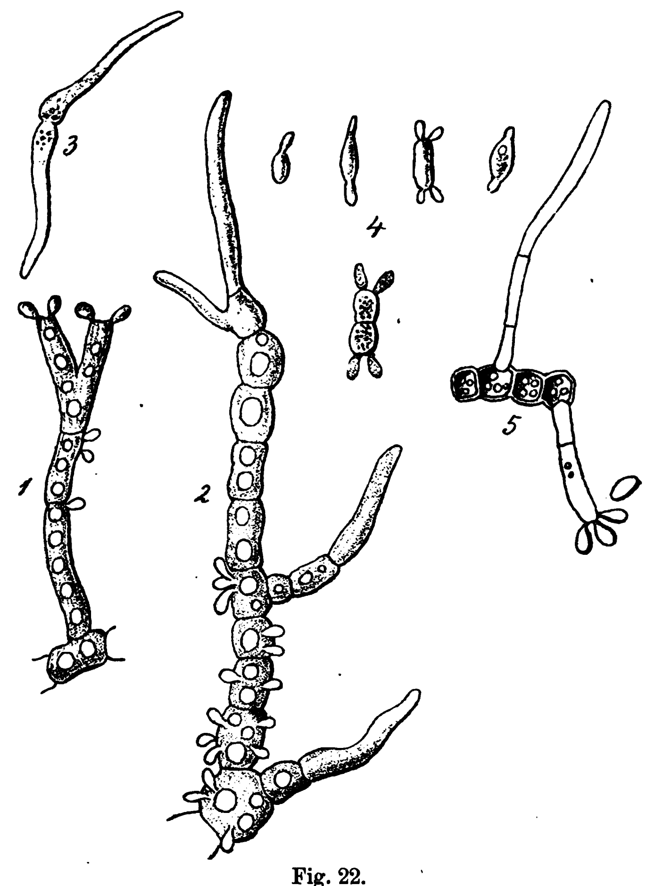



Fig. 22.

Dematium pullulans nach LOEW.

1, 2 ausgewachsene Mycelfäden mit hefeähnlichen Zellen, 3 Zellen letztgenannter Art, zu Mycelfäden auswachsend, 4 Zellen mit hefeähnlichen Sprossungen, 5 Auftreten von hefeähnlichen Zellen an den Keimschläuchen der braunhäutigen Zellen.

Generationen sich durch hefeartige Sprossungen fortpflanzen oder Keimfäden bilden, welche ein Mycelium hervorbringen (3). Hat dieses ein gewisses Alter erreicht, dann bildet es zahlreiche, dicht nebeneinander gestellte Scheidewände und wird nach und nach bräunlich oder olivengrün (5); hierin haben wir das Ruhestadium der Pflanze. — In HANSENs Luftanalysen wurde Dematium sehr häufig auf Würze gefunden, welche der Luft ausgesetzt war, vom Frühjahre bis zum Spätherbste; er beobachtete, dass, wenn der Pilz auf zuckerhaltigen Flüssigkeiten ausgesät wird, er anfangs nur Mycelfäden entwickelt; nach einiger Zeit aber werden die hefeähnlichen Zellen abgeschnürt, ohne eine Alkoholgärung hervorzubringen. — PASTEUR hat in Études sur la bière diese Pflanze sehr ausführlich behandelt. Da sie in so reichlicher Menge an der Oberfläche der Weinbeeren auftritt, wo sich die Weinhefe entwickelt, und da diese oft dasselbe Aussehen wie die von Dematium abgeschnürten hefeähnlichen Zellen hat, konnte man vermuten, dass ihre Konidien und die Weinhefezellen (Saccharomyces) identisch waren. PASTEUR spricht sich an verschiedenen Orten genannten Buches hierüber verschieden aus, indem er in gewissen Verbindungen dieses Zusammengehören nur als eine Vermutung, an anderen Orten dagegen als eine Thatsache aufstellt. Wir haben hier wieder ein Beispiel der früher genannten Bestrebungen die Hefenpilze (Saccharomyceten) auf die Schimmelpilze zurückzuführen. Nach den jetzigen Untersuchungsmethoden lässt die Frage keinen Zweifel mehr: Die eigentlichen Weinhefepilze können unter gewissen, jetzt bekannten Bedingungen in ihrem Innern Sporen hervorbringen. Unter denselben Umständen entwickeln die Konidien von Dematium keine Sporen und sind dadurch von der Weinhefe verschieden. Es finden sich mehrere Dematium-Arten; von einer dieser teilt LINDNER mit, dass sie durch ihre Entwickelung in Würze bewirkt, dass diese Flüssigkeit fadenziehend wird.

11. Endlich nennen wir einen Pilz, welcher u. a. auch auf vergärbaren Flüssigkeiten und in Gärungsräumen auftreten kann: Cladosporium herbarum. Der Pilz tritt bisweilen in Gärungsräumen in sehr grosser Menge auf; ich traf vor einigen Jahren in einem Untergärungsraume die Decke und einen Teil der Wände mit kleinen schwarzen Flecken dicht besetzt; sie bestanden aus

diesem Pilze, dessen Konidien ich daher auch immer in der Hefe traf. Die Pflanze besteht aus einem gelbbraunen Mycelium mit kurzen, geraden, steifen und spröden Fäden, von welchen die emporwachsenden in ihrer obersten Partie Konidien von den verschiedensten Formen — kugelige, ovale, cylindrische, gerade oder gekrümmte — hervorbringen können. Die systematische Stellung des Pilzes und seine mögliche genetische Verbindung mit anderen bekannten Pilzen ist eben so wenig klargelegt, wie sein Einfluss auf die Nährflüssigkeit. ERIKSSON giebt an, dass der Roggen bisweilen von Cladosporium befallen wird, und dass der Pilz, in solchem Brode oder in Bier genossen, Krankheiten beim Menschen hervorbringen kann.

Über diese oder wenigstens nahe verwandte Formen gab ZOPF eingehende morphologische Untersuchungen mit zahlreichen Abbildungen in seiner Abhandlung über Fumago. Diese letztgenannten „russthauartigen“ Pilze treten auf Pflanzenteilen sehr allgemein auf. Mit Recht sagt FRANK: Hinsichtlich der specifischen Unterscheidung sind wir noch ganz im Unklaren, woran namentlich der reiche Polymorphismus derselben und der Umstand, dass die einzelnen Entwickelungsformen fast nie beisammen gefunden werden, Schuld sind.

---

# 5. Kapitel.

## Die Alkoholgärungspilze.

### Einleitung.

Es liegt nicht innerhalb des Rahmens einer kurzgefassten Darstellung wie diese, eine detaillierte historische Übersicht des Wissens vergangener Zeiten zu geben. Nur so viel soll hervorgehoben werden, als gerade für das Verständnis der gegenwärtigen Sachlage notwendig ist. Wie die Arbeiten des letzten Decenniums wesentlich aus mehr oder weniger direkt von der

Praxis gegebenen Veranlassungen hervorgingen, fordern auch die gewonnenen Resultate mit voller Berechtigung dazu auf, dass sie in der Praxis verpflanzt und daselbst verwertet werden. Dies kann aber selbstverständlich nur geschehen, wenn das rechte Verständnis für das Wesentliche in den wissenschaftlichen Arbeiten vorhanden ist. Der Zweck der hier folgenden Darstellung ist, ein solches Verständnis zu erleichtern.

Das Wort Alkoholgärungspilze, allgemein benutzt, ist sehr umfassend. Sowohl Schimmelpilze, wie Bakterien und Sprosspilze können eine Alkoholgärung ausführen. Im folgenden werden wir uns nur mit den letztgenannten beschäftigen: Unter den Sprosspilzen können einige zugleich mit einem Mycelium auftreten, während eine solche Entwickelungsform bei andern als Regel nicht auftritt; innerhalb dieser letztgenannten Sprosspilze wurde wieder eine Gruppe auf Grund ihrer Fähigkeit, endogene Sporen bilden zu können, unter dem Namen Saccharomyceten ausgeschieden.

Im Jahre 1870 gab REESS seine „Botanischen Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze" aus. In diesem für seine Zeit bedeutungsvollen Werke wurde nachgewiesen, dass einige Sprosspilze die Fähigkeit besitzen, Sporen in ihrem Innern zu bilden, und so weit die vorhandenen sehr unvollkommenen Untersuchungsmethoden es erlaubten, wurde es wahrscheinlich gemacht, dass eine selbstständige Gruppe derartiger Sprosspilze sich findet. Diese Gruppe bezeichnet REESS mit dem Gattungsnamen Saccharomyces. (Weniger konsequent nahm er doch in dieser Gattung Arten auf, welche nicht Sporen bilden, und in dieser Richtung wurde er von DE BARY gefolgt in der „Vergl. Morphologie und Biologie der Pilze" 1884. Hierdurch brach REESS selbst eigentlich sogleich das systematische Gebäude nieder, dessen Aufführung er eben in Angriff genommen hatte.) Die Bedingungen dafür, dass solche Vermehrungsorgane in den Zellen auftraten, waren jedoch nicht bekannt; beim Experimentieren ging daher Alles aufs Geradewohl aus, eine bestimmte Methode hatte man nicht. Im genannten Buche gab REESS ferner ein System der Saccharomyceten, indem er sich auf die Grösse und Form der Zellen allein stützte. Eine solche auf rein mikroskopischen Merkmalen basierte Aufstellung von Arten hat sich jedoch als

ganz verfehlt erwiesen; es ist daher unmöglich, durch die von REESS aufgestellten Charaktere die Arten von einander zu trennen. Eine eigentlich praktische Bedeutung konnte folglich seine Arbeit nicht gewinnen; und da die wesentlichsten Bedingungen für die Sporenbildung ihm sowie seinem Nachfolger ENGEL unbekannt blieben, so dass es ein reiner Zufall war, ob man in einer Kultur von Saccharomyceten sporenbildende Zellen erhielt oder nicht, so erklärt man sich leicht die Erscheinung, dass in den folgenden Jahren die Existenz der Sporen bezweifelt, und dass darüber gestritten wurde, ob die in der Praxis verwendeten Hefenrassen die Fähigkeit zur inneren Sporenbildung verloren hatten oder nicht. BREFELD stellte endlich als Dogma fest, dass der Kulturhefe diese Fähigkeit gänzlich abging. In dieser Verwirrung wurde erst dann Klarheit gebracht, da HANSEN die Gesetze für die Sporenbildung fand und auf dieser Grundlage zum ersten Male eine analytische Methode ausarbeitete.

PASTEURs „Études sur la bière" erschienen im Jahre 1876. Durch dieses Werk wurde die Kenntnis zu den Gärungen nach mehreren Seiten wesentlich gefördert. Die von ihm schon in früheren Schriften mit grosser Kraft verteidigte Lehre, dass jede Gärung und jede Fäulnis durch Mikroorganismen bedingt sind, bildet gleichfalls den Hauptinhalt dieses Werkes. Mit Recht hat man PASTEURs Namen an diese wichtige Lehre geknüpft, denn es ist namentlich durch seine Untersuchungen, dass sie eine wissenschaftliche Begründung erhielt. Die Ideen dazu können wir weit zurück in der Zeit verfolgen; schon zu den Zeiten LINNÉs wurde die Auffassung von mehreren Gelehrten, auch von LINNÉ selbst, geltend gemacht, dass die Gärungs- und Fäulnisprozesse durch mikroskopische Lebewesen bewirkt werden; Beweise hierfür kamen doch erst viel später hervor. Im Jahre 1836 wies CAGNIARD LATOUR nach, dass die Bier- und Weinhefe aus Zellen besteht, welche sich durch Sprossung vermehren, und dass diese Zellen die Alkoholgärung hervorrufen. Kurz danach kam SCHWANN zu demselben Resultate. Schon im Jahre 1838 trat die Anschauung hervor, dass verschiedene Gärungen durch verschiedene Mikroorganismen eingeleitet werden. TURPIN sprach zu dieser Zeit den folgenden Satz aus: „Keine Zersetzung des Zuckers, keine Gärung ohne die physiologische Wirksamkeit einer Vegetation."

Die Seite 16 berührten Versuche über die Urzeugung (generatio aequivoca oder spontanea), durch welche bewiesen wurde, dass die Umbildungen organischer Substanzen immer durch die von aussen kommenden Keime hervorgebracht werden, schlossen sich hieran an. Bedeutungsvolle Entdeckungen stammen niemals von einem einzigen Manne her, sie sind vielmehr die Resultate der Arbeiten mehrerer Forscher; es ist aber im allgemeinen viel leichter die Idee irgend einer Wahrheit auszusprechen als den hinlänglichen Beweis dafür zu führen Obgleich also die Prinzipien in ihrer grossen Allgemeinheit schon gegeben waren, da PASTEUR im Jahre 1857 diese Untersuchungen in Angriff nahm, so fehlten doch noch sehr wesentliche Glieder, welches namentlich daraus klar hervorgeht, dass LIEBIG wieder die Versuche STAHLs hervorziehen konnte, um die Gärungs-Phänomene in rein chemischer Weise zu erklären. Durch den Sieg, welchen PASTEUR in diesem Streite davontrug, legte er die Grundlage zu seinem grossen Ruhme.

Es wird in den Études sur la bière klar und unwidersprechlich dargethan, welche Macht die mikroskopischen Lebewesen besitzen, und es wird stark betont, dass die Bakterien einen durchgreifenden Einfluss auf den Verlauf der Alkohol-Gärung und auf den Charakter des Bieres ausüben können. Die Sprosspilze werden ebenfalls abgehandelt; für einzelne nicht genauer beschriebene Pilze dieser Gruppe wird, wie es auch schon früher von BAIL und von einigen Zymotechnikern geschah, angedeutet, dass sie auf die Beschaffenheit des Gärungsproduktes in verschiedener Weise einwirken können. Was PASTEUR hier mitteilt, sind aber eben nur Andeutungen und zwar nach zwei einander widerstreitenden Richtungen hin. Dies tritt z. B. in seinen Beobachtungen über die sogenannte Käse-Hefe und aërobiotische Hefe stark hervor: Möglicherweise ist hier die Rede von selbständigen, eigentümlichen Hefearten, möglicherweise aber auch nur von durch eine gewisse Behandlung der gewöhnlichen Brauereihefe umgebildeten Formen. Es darf aber nicht übersehen werden, dass er über seinen Standpunkt klar ist und selbst betont, worin man die Ursache suchen muss, dass die Frage nicht entschieden werden konnte, nämlich darin, dass es damals nicht möglich war, zu entscheiden, ob man von Anfang an mit einer oder mit mehreren

Spezies arbeitete; eine exakte Methode zur Reinkultur der Hefearten war zu dieser Zeit, wie voran gezeigt (siehe S. 16—24), noch nicht aufgefunden. Eine wirkliche Orientierung in dieser Welt der Mikroorganismen findet man folglich in diesem Werke nicht; es ist an keinem Punkte der PASTEURschen Darstellung möglich, solche Charaktere für die Sprosspilze zu finden, dass darauf eine Analyse basiert werden kann. Für PASTEUR sind auch alle Sprosspilze mit einigermassen ausgeprägter Fähigkeit zur Alkoholgärung dasselbe wie Saccharomyceten; es ist an keinem Orte klar, ob von echten Saccharomyceten oder von anderen Sprosspilzen die Rede ist. Diese Hefenpilze, welche in unserem jetzigen Systeme zu sehr verschiedenen Abteilungen gehören, werden ferner als Entwickelungsstufen von dematiumähnlichen Schimmelpilzen aufgestellt, ohne dass doch hierfür die Beweise gegeben werden. Ob es verschiedene Arten solcher Sprosspilze (Saccharomyceten, Torula, Dematium u. s. w.) giebt oder nicht, wird von PASTEUR nicht entschieden. Seine Behandlung der von uns erwähnten botanischen Probleme muss überhaupt in den wesentlichen Punkten als eine verfehlte bezeichnet werden.

Die Ursache dazu, dass dieses Werk die in seiner Vorrede verkündigte Reform im Brauereibetriebe nicht durchführen konnte, ist am nächsten diese, dass es, wie es aus den vorangehenden Auseinandersetzungen hervorleuchtet, auf dem damaligen Standpunkte der Wissenschaft nicht möglich war, Klarheit über die Verhältnisse der verschiedenen Alkoholgärungspilze während des Gärungsprozesses herbeizuführen. PASTEUR konnte daher auf diesem Punkte nicht über die unbestimmten Vermutungen und widerstreitenden Anschauungen seiner Vorgänger hinaus kommen. Wenn er in seinem Werke (Études S. 4—7) eine Übersicht über die Mikroorganismen, welche Krankheiten im Biere verursachen, giebt, dann ist in Übereinstimmung hiermit auch nur von Bakterien die Rede, und diese Anschauung wird noch im Jahre 1883 von DUCLAUX, sowie von anderen französischen, deutschen und englischen Verfassern wiederholt. Auf der Grundlage dieser Studien empfiehlt PASTEUR den Brauern eine Reinigung der Hefe zu unternehmen, um diese von Bakterien zu befreien, z. B. dadurch, dass man die Hefe in einer Zucker-

lösung mit Weinsäure oder in Würze mit ein wenig Karbolsäure kultiviert.

Im Gegensatze hierzu trat HANSEN im Jahre 1883 mit seiner Lehre hervor, dass einige der gefährlichsten und gewöhnlichsten Krankheiten im untergärigen Biere nicht von Bakterien, sondern von bestimmten Saccharomycesarten herrühren, und dass mit dem Namen Saccharomyces cerevisiae nicht eine, sondern mehrere Species und Rassen bezeichnet werden, welche in den Brauereien Produkte verschiedener Art geben. Auf dieser Grundlage arbeitete HANSEN sein System aus, nach welchem eine Anstellhefe, aus einer einzigen Art bestehend, benutzt wird. Nach einigem Widerstande wurde dieses System in allen bierbrauenden Ländern anerkannt und in die Praxis eingeführt. In der letzten Zeit hat jedoch PASTEURs Mitarbeiter VELTEN in Marseille dieses System angegriffen, indem er findet, dass es ein Fehler bei HANSENs Hefe sei, dass sie nur aus einer einzigen Art oder Rasse besteht. Für PASTEURs gereinigte Hefe hebt er dagegen als einen Vorteil hervor, dass sie nach der oben beschriebenen Reinigung nicht aus einer, sondern aus mehreren Hefenrassen verschiedener Natur besteht, und diese Zusammensetzung von verschiedenen Rassen betrachtet er als notwendig, damit das Bier den erwünschten Geschmack und Bouquett erhalten kann. Hier berücksichtigt jedoch VELTEN nicht die Lehre HANSENs über die durch die Saccharomyceten im Biere hervorgerufenen Krankheiten, welche Lehre von PASTEUR selbst eben als ein Fortschritt begrüsst wurde. Im Folgenden werden diese Untersuchungen HANSENs ausführlich besprochen.

Wie aber PASTEURs Werk immer, wegen der Kraft, mit der der Einfluss von Bakterien in der Gärungsindustrie geltend gemacht wird, seine Bedeutung für die Praxis behält, so bietet es auch ein grosses theoretisches Interesse dar, besonders durch die darin aufgestellte neue Gärungstheorie, welche seiner Zeit mit Recht Aufsehen erregte.

Gegenüber BREFELD, welcher behauptete, dass die Hefe sich nicht ohne freien Sauerstoff vermehren könnte, und TRAUBE, welcher wohl einräumte, dass die Hefe sich ohne freien Sauerstoff zu entwickeln vermag, aber aufrecht hielt, dass sie dann die in der Flüssigkeit gelösten Eiweissstoffe zu ihrer Zellbildung

verbraucht, spricht PASTEUR den Satz aus, dass die Gärungsorganismen eine Gruppe von Lebewesen bilden, deren Funktion als Fermente gerade „eine notwendige Folge des Lebens ohne Luft, des Lebens ohne freien Sauerstoff" ist, und dass ferner eine solche Gärung auch in reinen Zuckerlösungen vor sich gehen kann. Er hält aufrecht, dass die Ursache, weshalb BREFELD die Hefe in feuchter Kammer in einer Atmosphäre von Kohlensäure nicht zur Entwickelung bringen konnte, darin lag, dass er mit alten Hefezellen operierte, während die Vermehrung der Hefe ohne freien Sauerstoff nur dann möglich ist, wenn die Zellen sehr jung sind. Die geringe Menge freien Sauerstoffes, die sich in den Flüssigkeiten, denen die Hefe zugesetzt wird, befindet, „verjüngt die Zellen und macht es ihnen möglich, die Fähigkeit zur Sprossung wieder aufzunehmen, das Leben zu bewahren und ihre Vermehrung ohne Zutritt der Luft fortzusetzen".

PASTEUR macht daher, wie schon voran berührt wurde, eine bestimmte Sonderung zwischen zwei Arten von Organismen: aërobiotischen, welche ohne Zutritt der freien Luft nicht leben können, und anaërobiotischen, welche die Luft entbehren können; diese letzteren sind seiner Auffassung zufolge „Fermente im eigentlichen Sinne des Wortes".

Es wäre unrichtig anzunehmen, dass die Gegenwart von Alkohol und Kohlensäure unter den Produkten einer Gärung absolut „Alkoholfermentorganismen im eigentlichen Sinne" voraussetzen müsse. Es zeigte sich nämlich in den von LECHARTIER und BELLAMY zuerst gemachten und später von PASTEUR erweiterten Versuchen, dass, wenn Weinbeeren, Orangen und andere Früchte, an welchen keine Hefezellen sich befanden, in abgesperrten, mit Kohlensäure gefüllten Räumen aufbewahrt wurden, eine Entwickelung von Kohlensäure und Alkohol stattfand. „Der Fermentcharakter ist daher nicht eine Existenzbedingung der Hefe; die fermentative Fähigkeit ist nicht Zellen spezieller Natur eigentümlich, ist keine permanente Struktureigentümlichkeit, sie ist eine Eigenschaft, die von äusseren Umständen und von einem Ernährungsmodus des Organismus abhängt."

„Die Gärung ist somit ein sehr allgemeines Phänomen. Sie ist das Leben ohne Luft, das Leben ohne freien Sauerstoff oder, noch allgemeiner, sie ist die notwendige Folge einer

mit Hilfe eines gärungsfähigen Stoffes ausgeführten chemischen Arbeit, welcher Stoff dazu fähig ist, durch seine Auflösung Wärme hervorzubringen, eine Arbeit, welche genau die Wärmemenge, die sie verbraucht, von einem Teile der Wärme entlehnt, welche durch die Auflösung der gärungsfähigen Substanz frei gemacht wird. Die Klasse von Gärungen im eigentlichen Sinne wird durch die geringe Zahl von Stoffen begrenzt, die sich unter Produktion von Wärme zu lösen vermögen, und die als Nahrung für niedere Organismen ohne Zutritt der Luft dienen können." Dies ist in kurzen Zügen die berühmte Gärungstheorie PASTEURs (Études, S. 261).

Die Oxydationsgärung, z. B. die Essigsäuregärung, welche ja eben, wie dies PASTEUR selbst beobachtet hat, reichliche Zufuhr von Luft erfordert, betrachtet er selbstverständlich nicht als eine eigentliche Gärung. Dass er übrigens seine Definition nicht im strengen Sinne des Wortes nimmt, dies geht daraus hervor, dass er selbst betont, dass die Hefe auch unter Luftzufuhr Gärfähigkeit besitzt ob zwar eine geringere, als wenn der Sauerstoff ausgeschlossen ist. Die Richtigkeit hiervon wurde für die Bierunterhefe speciell von PEDERSEN (1878) und HANSEN (1879) bestätigt, indem sie zu dem Resultate kamen, dass die Menge von Trockensubstanz, welche eine bestimmte Hefemenge in Bierwürze zu Alkohol, Kohlensäure u. s. w. umbildet, geringer ist, wenn die Flüssigkeit während der Gärung gelüftet, als wenn sie nicht gelüftet wird. Ein ähnliches Resultat erhielt ED. BUCHNER (1885) in seinen Untersuchungen in dieser Richtung mit Bakterien.

HANSEN stellte seine Versuche in der Weise an, dass die Zellen in dem Gefässe, welches gelüftet wurde, unaufhörlich herumgewirbelt und von der reichlich eingeblasenen Luft umströmt wurden. Da sie dessenungeachtet eine deutliche Alkoholgärung gaben, so ging also hieraus mit Sicherheit hervor, dass diese nicht von dem Leben ohne Luft bedingt ist.

In seiner „Theorie der Gärung" (1879) zeigte NÄGELI, dass Zutritt von Sauerstoff der Alkoholgärung in einer Zuckerlösung sogar besonders günstig ist, wenn sonst keine Nährstoffe zugegen sind, und infolge dessen die Hefemenge sich nicht oder nur unbedeutend vermehrt. NÄGELI sagt daher (S. 26): „Die Theorie PASTEURs, dass die Gärung durch Mangel an Sauerstoff erfolge,

indem die Hefezellen gezwungen seien, den Bedarf an Sauerstoff dem Gärmaterial zu entnehmen, ist durch alle Thatsachen, die auf diese Frage Bezug haben, widerlegt".

In der neuesten Zeit haben namentlich HUEPPE und seine Schüler sich gegen PASTEURs Gärungstheorie gewendet und Beispiele von Ferment-Organismen hervorgezogen, „welche die specifischen Fermentationen bei Gegenwart von Luftsauerstoff, meist sogar besser, auszunützen vermögen".

Aus NÄGELIs mannigfaltigen Arbeiten über die niederen Organismen werden wir, an das Vorhergehende anknüpfend, sonst nur die von ihm aufgestellte „molekular-physikalische" Gärungstheorie, welche wesentlich als eine Modifikation der LIEBIGschen auftritt, erwähnen. Während PASTEUR die Gärung als das Resultat einer in der Zelle vor sich gehenden Wirksamkeit erklärt, definiert NÄGELI die Gärung als eine Übertragung von Bewegungszuständen der Moleküle, Atomgruppen und Atome verschiedener, das lebende Plasma zusammensetzender Verbindungen (welche dabei selbst keine Veränderung erleiden) auf das Gärmaterial, wodurch das Gleichgewicht in dessen Molekülen gestört wird und dieselben zum Zerfallen gebracht werden. Bei der Gärung werden so die Schwingungen der Plasmamoleküle auf das Gärmaterial übertragen. Die Gärungsursache befindet sich im lebenden Plasma, also im Innern der Zelle, wirkt aber ziemlich weit über die Zelle hinaus. Die Zersetzung des Zuckers — namentlich in Alkohol und Kohlensäure — erfolgt zum geringeren Teile innerhalb der Hefezellen, zum grösseren Teile ausserhalb derselben. Diese Theorie steht so im Gegensatze zu der PASTEURschen und schliesst sich denen von STAHL und LIEBIG an.

In BREFELDs zahlreichen mykologischen Abhandlungen nehmen die Sprosspilze einen ziemlich hervorragenden Platz ein; so zeigte dieser Naturforscher, dass viele Ustilagineen (Brandpilze), Basidiomyceten und andere Pilze in ein solches Sprosspilzstadium eintreten können. Ähnliches war übrigens früher von BAIL, REESS, ZOPF und anderen Forschern erwiesen, und da von BREFELD nicht nachgewiesen wurde, ob diese Formen die für die Saccharomyceten charakteristische endogene Sporenbildung haben, auch nicht, ob sie eine ausgeprägte Fermentwirksamkeit entfalten können,

so verloren seine unklaren Behauptungen, dass sie mit den Saccharomyceten gleichwertig seien, allen Grund.

In der Reihe der verschiedenen Gärungstheorien wird der Kernpunkt aller hierhergehörigen Fragen gar nicht berührt: Woher kommt es, dass in diesen mikroskopischen Zellen das Plasma, welches bei den verschiedenen Arten dasselbe Aussehen hat, doch in der einen Zelle eine Essigsäuregärung, in der andern eine Buttersäuregärung hervorruft, in dieser Zelle den Rohrzucker direkt zu vergären vermag, in jener dagegen erst nach einer vorhergehenden Umbildung? Die Ursache dieser verschiedenartigen Wirksamkeit des Plasmas ist noch ein ungelöstes Rätsel.

Die bisher aufgestellten Gärungstheorien geben keine zusammenfassende Erklärung der bekannten Thatsachen, und sie haben folglich für uns nur ein historisches Interesse.

---

Unsere Kenntnisse von den Alkoholhefepilzen waren somit, als HANSEN seine Untersuchungen aufnahm, sehr lückenhaft und unsicher; diese Untersuchungen mussten auf experimentellem Wege von Grund aus angegriffen werden. Dies hat HANSEN in seinen beinahe dreizehn Jahre hindurch fortgesetzten Arbeiten ausgeführt, und das grösste Interesse knüpft sich daher an die Frage: Durch welche Untersuchungen gelang es ihm, diese Aufklärungen über die Saccharomyceten zu schaffen, welche schon jetzt — und nicht nur vom wissenschaftlichen Standpunkte aus — eine tiefere Einsicht gestattet haben, die uns aber auch so weit führten, dass dadurch eine die Hefenfrage betreffende Reform in der Industrie durchgeführt wurde? Diese Frage wollen wir deshalb zunächst erörtern.

## Hansens Untersuchungen.

Als HANSEN im Jahre 1878 seine Schrift über „Organismen in Bier und Bierwürze“ ausarbeitete, hob er die Unsicherheit hervor, welche in den Arbeiten über die eigentlichen Saccharomyceten herrschte; er betonte, dass es nicht möglich war, auf dem von seinen Vorgängern betretenen Wege weiter zu kommen, dass vielmehr die Untersuchungen, wenn sie weiter führen sollten,

was namentlich PASTEUR und REESS begonnen, von ganz anderen Gesichtspunkten aus angegriffen werden müssen. Erst im letzten Teile des Jahres 1881 gelang es ihm, den Schlüssel zur Lösung des Problems zu finden. Die Aufgabe war: die Methode in der Weise auszubilden, dass man Vegetationen erhalten konnte, deren jede von einer Zelle abstammte, um daraus durch experimentelle Untersuchungen ins Klare zu bringen, ob diese so garantierten Reinkulturen konstante Charaktere darböten — also inwiefern die Saccharomyceten als Art, Varietät oder Rasse auftreten — und im bestätigenden Falle, worin diese Merkmale bestanden. Wenn dieses Problem gelöst war, musste die folgende Aufgabe die sein, zum ersten Male eine Methode zur Analyse der Hefe zu entwickeln und die Lebensbedingungen dieser Organismen von verschiedenen Seiten zu studieren.

### 1. Darstellung der Reinkultur.

Schon an einem früheren Orte in dieser Darstellung wurde hervorgehoben, wie man von verschiedenen Seiten den Gedanken aussprach, dass die Bedingung für unsere Kenntnisse der mikroskopischen Organismen, von welchen wir in jedem Tropfen unter dem Mikroskope Hunderte oder Tausende finden können, lediglich diese ist, dass man das Individuum ausscheidet und mit einer von ihm stammenden reinen Vegetation arbeitet. Gleichzeitig wurden in aller Kürze die verschiedenen Wege, welche man eingeschlagen hatte, angedeutet.

HANSEN hat in seinen Schriften wiederholt hervorgehoben, dass die einzige in allen Fällen sichere Methode die ist, den Ausgangspunkt von dem Individuum zu nehmen und den Anfang von diesem aus zu konstatieren. Er benutzt hierzu zwei verschiedene Methoden: Die Kultur auf festem Substrate und die Kultur in Würze, in beiden Fällen nach vorheriger Verdünnung, wie dies auf S. 20—24 beschrieben wurde.

Mit Hilfe der eingeholten Kenntnis der Arten wurde es möglich, diese Methoden einer eingehenden Prüfung zu unterwerfen, dessen Resultat war, dass sie sich als exact zeigten.

Ist die Aufgabe die, aus einer gemischten Vegetation verschiedener Arten solche zu isolieren, die im geschwächten Zustande sich befinden, dann muss man, wie HANSEN bemerkt, die Ver-

dünnung und Aussaat in einer günstigen Nährlösung, z. B. Würze benutzen, indem hier also unter den für den betreffenden Organismus günstigsten Ernährungsbedingungen gearbeitet wird.

Liegt dagegen der andere Fall vor, dass man aus einer gemischten Vegetation die Art auszuscheiden wünscht, welche in kräftiger Entwickelung zugegen ist und deren Gedeihen folglich nicht von besonders günstigen Ernährungsbedingungen abhängt, so kann man schneller und mit geringerem Aufwand zum Ziel gelangen durch die Anwendung eines festen Nährsubstrates, hier Gelatine und Würze. Es ist dargethan, dass ein Zusatz von Gelatine zur Würze ihren Wert als Nährmaterial für die Hefepilze herabsetzt; dieser Nachteil wird jedoch im gegebenen Falle durch die obengenannte Bedingung, dass die Vegetation, aus welcher die Reinkultur dargestellt werden soll, jung und kräftig ist, von geringerer Bedeutung. Ein Vorteil dieser Methode in der Form, wie HANSEN sie für das Studium der Alkoholgärungspilze ausarbeitete, ist, dass es hier möglich wird, das Individuum direkt unter dem Mikroskope zu beobachten und seiner weiteren Entwickelung zu folgen, indem die Gelatineplatte sich in der feuchten Kammer befindet. Ich verweise auf die frühere Darstellung Seite 22—24.

### 2. Die Analyse.

Durch die ganze Reihe der Arbeiten HANSENs geht ein bestimmter Gedanke, nämlich der, dass die Form, das Grössenverhältnis und das Aussehen der Zelle an und für sich nicht hinreichen, um Artencharaktere geben zu können, indem dieselbe Art bei verschiedener äusserer Einwirkung in ganz verschiedener Weise, mit ganz verschiedenem Gepräge auftreten kann, die Form und die Entwickelungsphasen der Zelle aber, von einer anderen Seite gesehen, sehr wichtige Unterscheidungsmerkmale für die Arten geben. Es zeigt sich nämlich, dass es Grenzen der Einwirkung giebt, welche auf die Zellen ausgeübt wird, dass die verschiedenen Arten auf dasselbe Eingreifen in verschiedener Weise reagieren; dies kann nur so erklärt werden, dass sich hierbei innere, den speciellen Zellen selbst innewohnende Charaktere geltend machen.

Wir geben im Folgenden eine kurze Darstellung der ver-

schiedenen Wege, auf welchen Charaktere der Arten von HANSEN entdeckt wurden. Diese Untersuchungen bilden zugleich Beiträge zur allgemeinen Physiologie der Sprosspilze.

a) Das mikroskopische Bild der Bodensatzhefe.

Die erste Untersuchung einer Hefenvegetation geht selbstverständlich immer in der Weise vor sich, dass man zur vorläufigen Orientierung eine Probe der Hefe direkt unter das Mikroskop bringt. Als Beispiele dafür, was auf diesem Wege erreicht werden kann, verweise ich auf die folgenden Figuren (25, 28 u. s. w.), welche die Bodensatzhefeformen der sechs von HANSEN speciell behandelten Arten von Saccharomyceten darstellen. Die Vegetationen wurden dadurch hervorgebracht, dass die Zellen, welche einige Zeit in Würze kultiviert waren, danach mit neuer Würze versehen zu einer kräftigen Entwickelung bei 25—27° C. in 24 Stunden gebracht wurden. Vergleicht man nun z. B. die Figuren von Saccharomyces cerevisiae I mit den drei Pastorianus-Arten, so zeigt das Totalbild einen auffallenden Unterschied: Die Sacch. cerevisiae besteht vorzugsweise aus grossen, runden oder ovalen Zellen, die Pastorianus-Arten besitzen meistens gestreckte, wurstförmige Zellen; ganz anders stellt sich jedoch die Sache, wenn man Zellen der ersten Art mit Zellen einer der anderen genannten Arten vermischt; es ist dann, wenn man nur auf die Formen Rücksicht nimmt, nicht möglich, die grösseren und kleineren ovalen und runden Zellen der Pastorianus-Art von vielen der Sacch. cerevisiae-Zellen zu unterscheiden. Die zwei Arten Sacch. ellipsoideus I und II besitzen (Fig. 34 und 36) überwiegend ovale und runde Zellen; wurstförmige Zellen kommen jedoch auch vor, und hier wird es folglich ebenfalls nicht möglich sein, durch die Formen eine Bestimmung der Arten zu erreichen, wenn sie mit Sacch. cerevisiae oder Sacch. Pastorianus vermischt sind.

Durch direkte Messungen dieser Bodensatzformen werden auch keine Anhaltspunkte gefunden.

Dagegen wird eine Übersicht über die sechs Figurengruppen von Reinkulturen sofort ergeben, dass man hier 3 verschiedene Abteilungen von Sprosspilzen vor sich hat, deren eine von Sacch. cerevisiae repräsentiert wird, während die zweite die drei Pastorianus-Arten, die dritte die zwei ellipsoiden Arten umfasst. — So

viel, aber auch nur so viel ermöglicht die rein mikroskopische Beobachtung, und, das muss hervorgehoben werden, nur unter den angegebenen Kulturbedingungen.

### b) Die Askosporenbildung.

Durch HANSENs Untersuchung der in den echten Saccharomyceten vor sich gehenden endogenen Sporenbildung wurde das erste Glied einer wirklichen analytischen Methode auf diesem Felde geschaffen. Wir geben eine kurze Darstellung des experimentellen Vorganges und der gewonnenen Resultate im allgemeinen.

Die Sporenbildung in den Hefezellen wurde, wie oben berührt, von verschiedenen Forschern untersucht; von allen diesen einander zum Teil widerstreitenden Untersuchungen blieb aber nur das eine als richtig zurück, dass die Saccharomyces-Zelle unter gewissen, damals noch nicht bekannten Verhältnissen in ihrem Innern Sporen bilden konnte.

Durch vielfache Experimente gelang es dann HANSEN, die folgenden Gesetze für die Sporenbildung bei den Saccharomyceten aufstellen zu können:

1. Die Zellen müssen reichlichen Zutritt zur atmosphärischen Luft haben und auf eine feuchte Oberfläche ausgesäet sein.
2. Nur junge, kräftige Zellen können diese Funktion ausführen.
3. Für die zahlreichen untersuchten Arten liegt das Temperatur-Optimum in der Nähe von 25° C.

Nur ausnahmsweise bilden einige Saccharomyceten Sporen, wenn sie sich in gärenden Närlösungen befinden.

Die Hefe wird entwickelt wie auf Seite 98 angegeben. Eine geringe Menge dieser Hefe wird auf vorher sterilisierte Gipsblöckchen übergeführt; diese Blöckchen befinden sich in flachen, bedeckten Gläsern und werden dadurch feucht gehalten, dass die Gläser zur Hälfte mit Wasser gefüllt sind [1]). Gilt es

1) Die Askosporen können auch dadurch hervorgebracht werden, dass die Hefe auf sterilisierte, erstarrte Gelatine in einem feuchten Raume angebracht wird; ebenso auch in Hefenwasser und sterilisiertem Wasser; endlich können auch in den Hautbildungen der Saccharomyceten sporenbildende Zellen auftreten.

nun bloss, im allgemeinen die genannte Bildung hervorzurufen, dann kann man die Apparate bei gewöhnlicher Zimmertemperatur hinstellen.

Die Sporen treten dann nach dem Verlaufe einiger Zeit als kugelige oder zum Teil abgerundete Körper in den Zellen auf (Fig. 23). Oft zeigt sich dann in solchen Kulturen die sogenannte „Scheidewandbildung“. Diese rührt von einer Anschwellung der Sporen her, indem die Membran der Mutterzelle sich so dicht und stark um die Sporen spannt, dass es nur mittels Chemikalien oder durch eine Sprengung der Zelle möglich wird, die Wand dieser letztern deutlich zu erkennen; gleichzeitig üben die geschwollenen Sporen einen Druck gegen einander aus, und ihre Wände treten an den Berührungsflächen in genaue gegenseitige Verbindung; bisweilen werden dann die Reste des Plasmas der Mutterzelle als Keile oder Wände zwischen die Sporen gepresst; dann bilden entweder die Sporenwände allein oder die genannten Plasmawände oder beide zugleich die „Scheidewände“. Gewöhnlich kann man mittels eines Druckes auf das Deckgläschen die Sporen lostrennen; es giebt aber Fälle, wo dies nicht möglich ist, indem die Zellen so fest mit einander verbunden sind, dass sie nur bei einer gewaltsamen Einwirkung zerquetscht werden, und in diesen Fällen ist auch bei kräftigen Vergrösserungen eine Sonderung zwischen den Wänden nicht erkennbar; hier liegt dann eine wirkliche Verwachsung vor, die Zellen sind mehrkammerige Körper geworden.

Die Keimung der Sporen geht in der Weise vor sich, dass sie stark anschwellen und wie die vegetativen Zellen eine Knospe entwickeln.

Bei den Versuchen HANSENs kam es auch darauf an, darüber Klarheit zu schaffen, welchen Einfluss die verschiedenen Temperaturen auf die Bildung der Sporen seiner Reinkulturen ausübt, um zu lernen, ob die Arten sich gleich verhalten oder ob es möglich wäre, verschiedene Charaktere auf diesem Wege zu erzielen. Es mussten alsdann festgestellt werden: 1. die Grenztemperaturen, d. h. die höchste und niedrigste Temperatur, bei welcher die Sporen gebildet werden konnten; 2. die Optimums-Temperatur, d. h. die Temperatur, bei welcher die Sporen am schnellsten auftraten; und endlich 3. die Verhältnisse der zwischenliegenden Temperaturen.

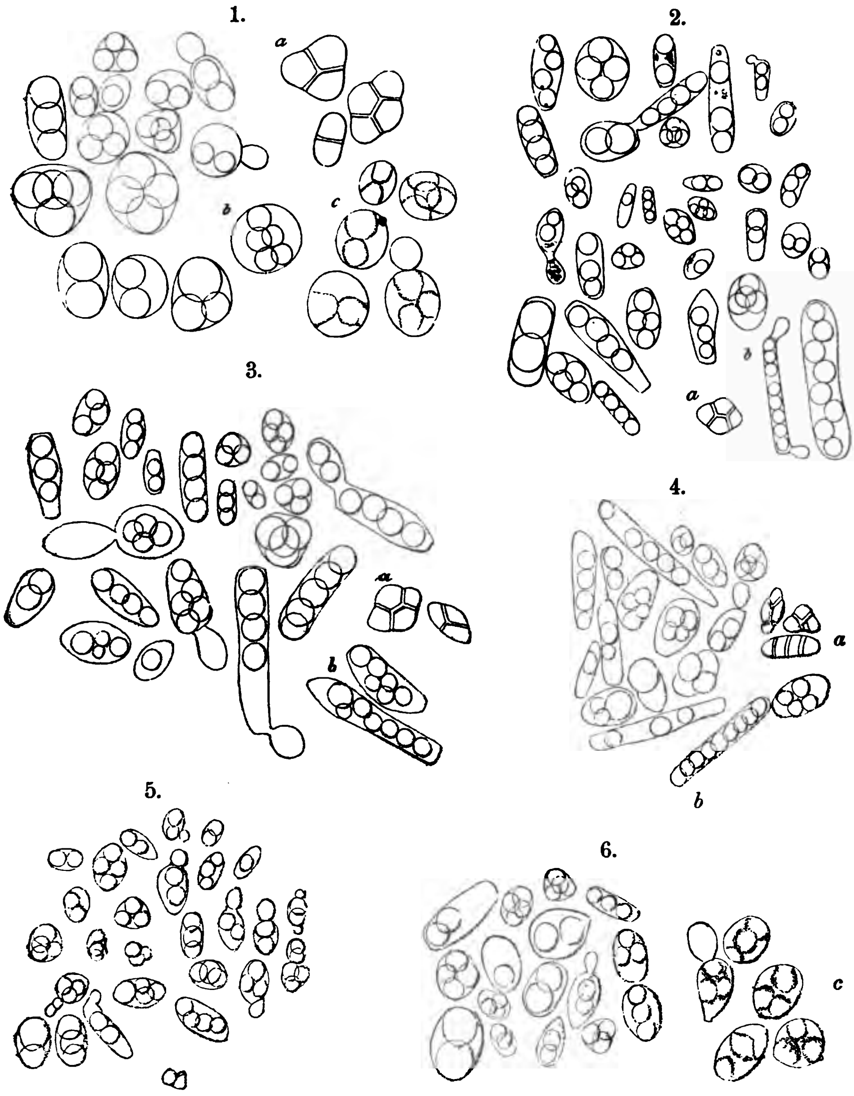



Fig. 23. Askosporenbildende Saccharomyceten.

1. Sacch. cerevisiae I, 2. Sacch. Postorianus I, 3. Sacch. Past. II, 4. Sacch. Past. III, 5. Sacch. ellipsoideus I, 6. Sacch. ellips. II, *a* Zellen mit Scheidewandbildungen, *b* Zellen mit grösserer Zahl von Sporen als normal, *c* Zellen mit deutlichen Anlagen zu Sporen. (Nach Hansen.)

Zur Bestimmung der gesuchten Zeitpunkte wird der Augenblick benutzt, wo die Zellen deutliche Anlagen zu Sporen gebildet haben. Diese Anlagen (cfr. Fig. 23, 1c und 6c) zeigen sich als Körper mit unregelmässigen Konturen, von den plasmatischen Teilen des Zellinhaltes gebildet. Es ist nicht möglich, zu den genannten Bestimmungen die reife Spore zu benutzen, da ein Criterium für die vollständige Reife nicht vorliegt.

Die Resultate HANSENs sind folgende:

Die Bildung der Sporen geht bei niedrigen Temperaturen langsam vor sich, schneller aber, wenn die Temperatur steigt, bis zu einem gewissen Punkte; passiert man diesen Punkt, dann wird die Entwickelung wieder verzögert, bis sie endlich innehält.

Als niedrigste Temperaturgrenze wurde für die sechs zuerst behandelten Arten $^1/_2$—3° C. gefunden, als höchste $37^1/_2$° C. Für diese sechs Arten, bei denen HANSEN die zwischenliegenden Temperatur- und Zeitproportionen bestimmte, zeigte sich, wenn diese zwei Grössen graphisch dargestellt wurden, indem die Wärmegrade als Abscissen und die Zeiträume als Ordinaten aufgetragen wurden, dass hierdurch krumme Linien entstanden, welche für alle sechs Arten im wesentlichen dieselbe Form hatten. Sie steigen von der Ordinate des niedrigsten Wärmegrades gegen die Abscissenachse herab und entfernen sich danach von dieser; gleichzeitig ergeben aber diese Kurven, dass namentlich die von der höchsten und niedrigsten Temperatur bestimmten Kardinalpunkte charakteristische Merkmale für die Arten geben, d. h. also, dass die Temperaturgrenzen, innerhalb welcher die Sporenbildung bei den einzelnen Arten vor sich gehen können, verschieden sind (cfr. S. 126f).

Was die Zeit betrifft, welche zur Bildung der Sporenanlagen bei den untersuchten sechs Arten unter denselben Temperatur-Verhältnissen vergeht, wurde folgendes beobachtet. Bei der höchsten Temperatur fordert die Entwickelung ca. 30 Stunden bei allen Arten; auch bei 25° C. war kein wesentlicher Zeitunterschied vorhanden; geht man aber mehr abwärts, dann treten augenfällige Differenzen ein. So bildet z. B. die Sacch.

cerevisiae I bei 11$^{1}/_{2}$° C. ihre Sporenanlagen erst nach 10 Tagen, die Sacch. Pastorianus II nach 77 Stunden u. s. w.

Bei allen Bestimmungen dieser Art übt der Zustand der Zellen einen sehr grossen Einfluss aus, je nachdem sie bei hohen oder niedrigen Temperaturen entwickelt wurden, alt oder jung, gehemmt oder kräftig entwickelt waren u. s. w. Daraus folgt, dass auch die Zusammensetzung der Nährflüssigkeit einen Einfluss ausübt. Bei methodischen, vergleichenden Untersuchungen dieser Art ist es daher eine notwendige Bedingung, dass die Zellen vorher immer in derselben Weise kultiviert werden. Variiert man diese äusseren Bedingungen, so muss man gleichzeitig die Grenzen für die Reaktionen der Arten demgegenüber bestimmen.

Nachdem HANSEN diese Beobachtungen gemacht hatte, gab er sogleich eine Methode zur praktischen Analyse der Brauereihefe an. Die in der Brauerei Alt-Carlsberg verwendete reinkultivierte Hefe (No. I.) bildet nämlich bei 25° C. ihre Sporen viel später als alle bisher untersuchten Krankheitserreger unter den Saccharomyceten. Hierdurch war folglich zum ersten Male eine wirkliche Analyse auf diesem Gebiete durchgeführt.

HOLM und POULSEN gelangten durch Versuche, zu dem Zwecke angestellt, zu bestimmen, wie weit HANSENs analytische Methode in der für die Praxis angestellten Analyse reicht, zu dem Resultate, dass man auf diesem Wege eine sehr geringe Einmischung wilder Hefe, etwa $^{1}/_{200}$ der ganzen Hefemasse, (Carlsberg Unterhefe No. I) mit Sicherheit nachweisen kann. Es wurde in früheren Versuchen von HANSEN dargethan, dass, wenn z. B. die zwei Arten Sacch. Pastorianus III und Sacch. ellipsoideus II, welche in dem Biere Hefentrübung hervorrufen können, nur in einem Verhältnisse von $^{1}/_{41}$ der Anstellhefe zugegen sind, die Krankheit sich nicht entwickeln wird, vorausgesetzt, dass Gärung und Lagerung in regelrechter Weise stattfanden; folglich wird eine Analyse der Hefe mittels der Askosporenbildung nach HANSENs Methode mehr als genügende Aufklärung geben können.

Daneben bietet diese Methode auch den Vorteil, dass die Analyse hierdurch mit Mischungen und in kurzer Zeit

durchgeführt werden kann. So wird man im obengenannten Falle durch eine Kultur bei ca. 25° C. nach 40 Stunden immer eine deutliche Antwort erhalten.

Wie angegeben, stellen sich die Kulturrassen verschieden, und hiernach ist die Versuchsanordnung zu bestimmen. Die von HANSEN rein kultivierte Carlsberg Unterhefe No. I wird, wie gesagt, am besten bei circa 25° C. analysiert. Eine Gipskultur von einigen der anderen Rassen bei derselben Temperatur angestellt, wird dagegen nur sehr schwer über die Beimischung wilder Hefen Aufschlüsse geben können, weil bei dieser Temperatur diese Rassen ihre Sporen nur sehr kurze Zeit nach den wilden Hefen entwickeln. Stellt man dagegen eine solche Kultur bei ca. 15° C. an, so zeigt sich, dass die Sporen in den Zellen der Kulturhefe später — oft viel später — ausgebildet werden als in den wilden Hefezellen.

Nach den ausführlichen Untersuchungen von HOLM und POULSEN gruppieren sich die in den Untergärungsbrauereien benutzten Kulturrassen um die zwei genannten Typen, indem sie also entweder bei 25° C. oder bei 15° C. analysiert werden können.

Von Wichtigkeit für die praktische Analyse dürfte auch die von HANSEN in der neuesten Zeit im Bau der Sporen entdeckten Differenzen zwischen Kulturhefen und wilden Hefen sein.

Eine Untersuchung der untergärigen Hefe auf die verschiedenen Stadien der Hauptgärung zeigt, wie dies von HANSEN schon im Jahre 1883 mitgeteilt wurde, dass die wilden Hefenarten als Regel erst in den letzten Stadien der Hauptgärung in den oberen Schichten der Flüssigkeit in grösserer Menge auftreten. Die Proben von der Flüssigkeit, welche man zur Analyse der Hefe vom Bottiche herausnimmt, müssen also nur in den letzten Tagen der Hauptgärung genommen werden. Verläuft eine längere Zeit, bevor die Hefe zur Analyse kommt, so muss man diese immer zuerst in Würze einführen und eine oder mehrere Gärungen durchmachen lassen, gleichgültig ob sie im trockenen oder feuchten Zustande zur Untersuchung vorlag[1]).

---

1) Die obengenannte Beobachtung über die untergärige Hefe wurde durch Versuche von J. VUYLSTEKE bestätigt, indem er Gärungen von Mischungen verschiedener Saccharomyceten in cylindrischen Glasgefässen, welche ca.

### c) Die Hautbildung.

Durch die Beobachtung der Hautbildungen der Saccharomyceten hat HANSEN auf einem ganz anderen Wege als im vorigen Falle Charaktere für die Arten gefunden. Es wird hierdurch wieder eine neue Bahn für das Studium dieser Pilze geöffnet, da die bisher von verschiedenen Verfassern in dieser Richtung gegebenen Andeutungen von dem wirklichen Verhalten abweichen.

Es ist ein allgemein bekanntes Phänomen, dass gegorene Flüssigkeiten mit Häuten bedeckt werden, und dies wurde hier einer durchgeführten Untersuchung unterworfen. Wie bekannt, haben namentlich die von Sprosspilzen gebildeten Häute — Mycoderma cerevisiae, Mycod. vini — die Aufmerksamkeit auf sich gezogen, und die häufige Erwähnung solcher Häute in der Litteratur führte dieselbe Folge mit sich, die auch von anderen Gebieten wohl bekannt ist: man hat so lange hierüber geredet als über etwas Bekanntes, bis man zuletzt glaubte, es wirklich zu kennen. Es zeigt sich nun, dass man sich in einem Irrtume befand.

HANSEN hat eine grosse Anzahl von Häuten behandelt, und darunter mehrere von solchen Formen, welche verschiedenen Arten von „Saccharomyces Mycoderma" — die keine endogene Sporenbildung besitzen — am nächsten kommen. Nach DE SEYNES, REESS und CIENKOWSKI sollen diese Mycoderma-Arten Askosporen bilden; es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass diese Forscher unreine, mit echten Saccharomyceten untermischte Häute vor sich gehabt haben. Es ist mit nicht geringer Schwierigkeit verbunden, die Reinheit einer solchen Kultur zu beurteilen, wenn man nicht mit einer Zelle beginnt; denn wenn die Mycoderma cerevisiae

---

2 Liter fassten, einleitete und Bestimmungen der relativen Verhältnisse zwischen den Arten durch Zählungen und Kulturen ausführte. Für Mischungen von obergärigen Hefen und wilden Hefenarten hat die genannte Regel aber nach den bisher gemachten Versuchen von VUYLSTEKE nicht allgemeine Giltigkeit. So zeigte sich in einigen Versuchen mit Mischungen von Sacch. cerevisiae I HANSEN und Sacch. Pastorianus I HANSEN eine Zunahme, in anderen Versuchen eine Abnahme der wilden Hefe gegen den Schluss der Hauptgärung. Dagegen zeigten alle Versuche mit Mischungen von Sacch. cer. I und Sacch. Past. III, dass die Verunreinigung in den oberen Schichten der Flüssigkeit am Ende der Hauptgärung stärker war als am Anfange, also wie in der Untergärung.

als Bodensatzhefe kultiviert wurde, nahmen die Zellen ein ganz anderes Aussehen an; sie wurden stärker mit Plasma gefüllt, während die Zellen der Häute, wie bekannt, plasmaarm sind, mit stark entwickelten Vakuolen. Solche Formen, welche gewöhnlich zu Mycoderma cerevisiae zugerechnet werden, bilden leicht und schnell Häute, ohne vorhergehende deutliche Gärung. Diese Häute sind auf Bier und Würze grauartig, trocken, werden später gefaltet und lichter von Farbe; zwischen den Zellen findet sich reichlich Luft eingemischt. Ähnliche Häute bilden die von HANSEN bearbeiteten Torulaformen; dagegen ist die Haut von Chalara Mycoderma klebrig, zähe und schwach glänzend; bei Monilia, die, wie früher erwähnt, mit sprossenden Zellen auftreten kann und die Saccharose direkt vergärt, ist die Hautbildung eigentümlich: schon während der kräftigen Gärung wird eine Haut auf den Schaumblasen gebildet, die sich nach und nach über die ganze Oberfläche ausbreitet und bisweilen Falten erhält. Die Zellen in dem Kolben sinken also zuerst als Bodensatzhefe herab, rufen eine lebhafte Gärung hervor und steigen mit den Kohlensäurebläschen wieder zur Oberfläche hinauf, wo sie in ein neues Entwicklungsstadium eintreten. Wird sterilisiertes Lagerbier mit diesem Pilze infiziert, so zeigt sich keine Gärung und es tritt nur eine dünne, staubähnliche Haut auf; unter anderen Verhältnissen bildete der Pilz eine weissmehlige wollartige Schicht wie bei Oidium.

Bei den eigentlichen Saccharomyceten treten ebenfalls Häute auf, von den obengenannten aber etwas verschieden, und das Gleiche gilt einigen der PASTEURschen Torula und „Saccharomyces apiculatus“. Nach dieser Beobachtung ist die Hautbildung nicht als etwas für gewisse Arten Eigentümliches, sondern als ein bei den Mikroorganismen allgemein vorkommendes Phänomen aufzufassen.

Bei den Saccharomyces-Arten tritt dieses Verhalten in seiner Allgemeinheit in der Weise hervor, dass, wenn man Kulturen in Würze kürzere oder längere Zeit bei gewöhnlicher Zimmertemperatur ungestört stehen lässt, sich bei der Beendigung der Hauptgärung nach und nach kleine Hefenflecken an der Oberfläche der Flüssigkeit zeigen; diese können später zu Figuren ver-

schiedener Form und Grösse zusammenfliessen, zu Inseln, deren aufwärts gekehrter Teil flach, deren herabgetauchter Teil gewölbt ist. Zuletzt schmelzen sie zu einer zusammenhängenden, in der Regel hell graugelben, schleimigen Haut zusammen, welche an der Wand des Glases als ein ganzer Ring fortgesetzt werden kann. Eine solche vollständige Hautbildung tritt zuerst auf, wenn die Hauptgärung beendigt ist. Schüttelt man den Kolben, dann werden einzelne Fetzen der Haut losgerissen und sinken zu Boden, und es kann sich in dieser Weise nach und nach eine ganze Schicht am Boden anhäufen, während die Haut sich immer erneuert und ein marmoriertes Aussehen erhält, da die jüngeren Partieen dünn und dunkel, die älteren dagegen dick und hell sind.

Die Bedingung dafür dass die Haut gebildet werden kann, ist eine freie, ruhige Oberfläche mit direktem Zutritte zur atmosphärischen Luft, und eine kräftige Hautbildung setzt eine reichliche Luftzufuhr voraus. Die Bedeutung dieser letzteren Bedingung für die Hautbildung bei den Saccharomyceten wurde durch das folgende Experiment dargethan. Zwei Reihen von PASTEURschen Kolben mit Würze von derselben Art und demselben Volumen wurden mit derselben Saccharomycesart infiziert und der Hautbildung überlassen. Die eine Reihe der Kolben war so angebracht, dass die gebogene Röhre in Wasser hinuntertauchte; die entwickelte Kohlensäure hob sich dann in Blasen durch das Wasser; die zweite Reihe wurde wie gewöhnlich hingestellt. Das Resultat war, dass sich wohl in beiden Fällen eine Haut bildete, aber unter sonst ganz gleichen Verhältnissen langsamer und schwächer in der ersten Versuchsreihe als in der zweiten. Hieraus folgt, dass in den CHAMBERLANDschen Kolben oder in gewöhnlichen Kochflaschen, mit Filtrierpapier überbunden, eine weit schnellere und kräftigere Entwickelung als in den PASTEURschen Kolben mit ihrer begrenzten Luftzufuhr stattfindet. Die Funktion der Hautbildung ähnelt also in dieser Beziehung die der Endosporenbildung.

Gleichzeitig mit der Hautbildung tritt immer eine Entfärbung der Würze ein, wodurch diese lichtgelb wird. Die Reaktion tritt am schnellsten bei höheren Temperaturen ein und tritt am augenfälligsten hervor bei den Arten, welche die kräftigste Hautbildung hervorbringen.

Die vorläufige Kultur der Zellen ist dieselbe wie die früher (S. 98) beschriebene. Von der gebildeten Vegetation wird die Flüssigkeit entfernt und neue sterile Würze hinzugefügt. Aus der geschüttelten Mischung von Hefe und Würze führt man einen Tropfen in Kochflaschen hinein, welche ca. 150 *ccm* fassen, zur Hälfte mit Würze gefüllt und mit Filtrierpapier überbunden sind. Dieser Prozess wird mit solcher Vorsicht unternommen, dass jede Infektion von aussen ausgeschlossen bleibt. HANSEN brachte dann die Kochflaschen bei verschiedenen Temperaturen an, und es wurde bestimmt:

1. Die Temperaturgrenze für die Bildung der Häute,
2. der etwaige Zeitpunkt für ihr Auftreten bei verschiedenen Temperaturen, und
3. das mikroskopische Aussehen der Vegetation bei den verschiedenen Temperaturen.

Der Schwerpunkt in diesen Untersuchungen der früher genannten sechs Arten liegt in dem mikroskopischen Aussehen der Häute dieser Arten bei gleichen Temperaturen, und wir erhalten hier wieder, von einem anderen Gesichtspunkte als im vorigen Abschnitte aus gesehen, eine durchgeführte Untersuchung über die Relation zwischen den eingreifenden Faktoren und den Formen, welche darthut, dass wir eben so vielen in ihrem innersten Wesen verschiedenen Typen oder Arten gegenüberstehen.

Die Untersuchung der Haut geschah, wo nichts Anderes bemerkt ist, wenn sie so weit entwickelt war, dass sie gerade mit dem blossen Auge gesehen werden konnte.

Ein Vergleich der einzelnen Befunde führt zu den folgenden Schlusssätzen:

Während es als allgemeine Regel hingestellt werden kann, dass die Zellen der alten Häute sehr auffälligen Formveränderungen unterworfen sind, zeigt es sich, dass die Zellen der Häute von Sacch. cerevisiae I., Sacch. Past. II. und Sacch. ellips. II. im jungen Zustande keine mycelartigen Kolonieen bilden; solche können dagegen sofort bei Sacch. Past. I. und III. und Sacch. ellips. I. auftreten. Hierin finden wir schon eine Verschiedenheit in der Natur dieser Arten.

Bei höheren Temperaturen geben die sechs Arten nur sehr wenige Anhaltspunkte für die Untersuchung, indem hier nur

Sacch. cerevis. I. und Sacch. ellips. II. sich von den übrigen unterscheiden. Ganz anders stellt sich jedoch die Sache, wenn man die jungen Häute bei 13—15° C. untersucht. Die zwei Arten Sacch. Past. II. und Sacch. Past. III., welche beide Obergärungshefen sind, und deren Zellen in der gewöhnlichen Aussaat nicht sicher von einander gesondert werden können, treten hier mit ganz verschiedenen Vegetationen auf, und einen ebenso auffallenden Unterschied findet man zwischen den sonst einander ähnlichen Arten Sacch. ellips. I. und II.

Eine Beobachtung der Temperaturgrenzen für die Bildung der Häute ergiebt, dass sie bei Sacch. cerevis. I. und S. ellips. I. bei ca. 38° und 5—6° C. innehält; für die drei Pastorianus-Arten liegen die Grenzen bei 34° und 3° C.; Sacch. ellips. II. hat dieselbe niedere Grenze wie die letztgenannten, ihre Maximaltemperatur liegt dagegen bei 38—40° C.

Die Zeitgrenzen, mit den früher für die Askosporenbildung gegebenen verglichen, zeigen, dass in beiden Fällen die Entwickelung bei niedrigen Temperaturen langsamer vor sich geht als bei höheren; bei Wärmegraden, welche nahe der Minimums- und Maximumstemperatur liegen, war die Hautbildung immer sehr schwach und unvollständig.

Bei Temperaturen oberhalb 13° C. hat die Haut der Sacch. ellips. II. eine so schnelle und kräftige Entwickelung, dass man lediglich hierdurch die Flaschen mit dieser Hefe erkennen kann. So giebt sie bei 22—23° C. eine vollständig deckende Haut nach 6—12 Tagen, während die fünf anderen Arten erst nach der dreifachen Zeit eine Haut, welche meistens schwächer entwickelt ist, geben. So giebt auch diese Art und Sacch. Past. III. bei Zimmertemperatur verhältnismässig schnell eine kräftige Haut, während die anderen Arten zur selben Zeit noch weit zurück sind.

Wie oben erwähnt, haben die Hautbildungen eine verschiedene Maximaltemperatur. Dies steht damit in Zusammenhang, dass die Maximaltemperatur der Arten für die Sprossung nicht dieselbe ist. Es wurde hier nachgewiesen, dass Sprossung und Gärung noch über die Temperatur hinaus stattfinden, bei welcher die Entwickelung einer Haut nicht mehr eintritt. So beobachtete HANSEN noch bei 38—40° C. eine lebhafte Gärung und Sprossung bei Sacch. cerevisiae I., Sacch.

ellipsoideus I. und Sacch. ellipsoideus II., bei 34° C. bei den 3 Arten der Gruppe Sacch. Pastorianus. Aber auch hier zeigten sich neue Anhaltspunkte zur Speciesunterscheidung, denn während die drei Pastorianus-Arten unter diesen Kulturverhältnissen nach höchstens 11 Tagen bei 36—38° C. abgestorben waren, lebten die drei anderen Arten nach derselben Zeit bei 38° C. Hieraus ergiebt sich auch, dass die früher aufgestellte Regel: die obergärigen Hefen können sich bei höheren Temperaturen als die untergärigen entwickeln, nicht richtig ist, und dass es ein Verhältnis zwischen dem Einflusse der Temperatur auf die Sprossung und Gärung einerseits und auf die Hautbildung andererseits giebt.

### d) Kultur auf festem Nährboden.

Durch passende Kulturen auf festem Nährboden wurden von HANSEN deutliche Charaktere für mehrere der Saccharomyces-Arten gefunden. Er benutzt hierzu Bierwürze mit Zugabe von ca. $5^1/_2$ pCt. Gelatine, in kleinen mit Baumwolle verschlossenen Kolben. Wenn diese Kolben mit den sechs bekannten Arten (Sacch. cerevis. I. Sacch. Past. I—III, Sacch. ellips. I—II) infiziert und bei 25° C. hingestellt werden, so treten im Laufe von 11 – 14 Tagen solche makroskopische Differenzen in den sich entwickelnden Vegetationen hervor, dass sich 4 mehr oder weniger scharf unter einander getrennte Abteilungen unterscheiden lassen. Eine Sonderstellung nimmt Sacch. ellips. I ein, dessen Vegetationsoberfläche sich durch eine eigentümliche, netzförmige Struktur auszeichnet, so dass diese Art hierdurch mit unbewaffneten Augen von den übrigen fünf unterschieden werden kann. — Benutzt man in ähnlichen Kulturen Hefewasser-Gelatine und stellt man den Versuch bei 15° C. an, so zeigt sich, dass Sacch. Past. II nach 16 Tagen Vegetationen mit ziemlich glatten Rändern bildet, während die von Sacch. Past. III deutlich haarig sind. Die mikroskopische Untersuchung ergiebt in diesem Falle, dass die beiden Arten auch morphologisch unterscheidbar sind. Dies ist aber bei Kulturen auf festen Nährböden durchaus nicht immer der Fall; oft treten unter solchen Umständen sogar geringere Differenzen hervor als durch Kulturen in Nährlösungen.

Für Mycoderma-Arten hat HANSEN, wie S. 155 angegeben, sehr charakteristische Kennzeichen von ihrem Verhalten in Würze-

gelatine gefunden, indem die Kolonieen im Gegensatze zu denen der Saccharomyceten sich schildförmig ausbreiten.

Hierzu gehört auch seine Beobachtung, dass einige Arten (z. B. Sacch. Marxianus und Sacch. Ludwigii) in festem Nährboden eine Mycelbildung entwickeln können, während andere nicht dazu imstande sind.

### e) Das Verhalten der Saccharomyceten und saccharomycesähnlichen Pilze gegenüber den Zuckerarten und den übrigen Bestandteilen der Nährflüssigkeit.

Der erste schlagende Beweis dafür, dass die Saccharomycesarten eine sehr verschiedene Arbeit in der Nährflüssigkeit ausführen können, wurde durch die seit HANSENs Entdeckungen im Jahre 1883 im Carlsberger Laboratorium und danach in vielen anderen Laboratorien dargestellten Reinkulturen der Hefen, welche später in der Praxis geprüft wurden, gegeben. Es giebt Brauereien, die schon eine grosse Reihe von Heferassen ganz unter denselben Bedingungen im Grossen probiert haben, und wo sowohl Vergärungsgrad wie Geschmack, Geruch, Klärungsdauer, Haltbarkeit gegen Hefentrübung u. s. w. sich für die einzelnen Rassen verschieden stellten. Die bahnbrechenden Untersuchungen HANSENs über die Krankheitshefen (1883) zeigten von einem anderen Gesichtspunkte wieder die durchgreifenden Unterschiede zwischen den Saccharomycesarten in ihren Wirkungen auf die Nährflüssigkeit, indem er unter den sogenannten wilden Hefenpilzen Gruppen entdeckte, welche schädliche Veränderungen im Biere hervorrufen, während andere sich als unschädlich zeigten. Unter den erstgenannten giebt es wieder solche, die dem Biere einen bitteren Geschmack und unangenehmen Geruch verleihen, ohne jedoch eine Trübung hervorzurufen, während andere erst spät in der Nachgärung ihre Wirksamkeit vollständig entfalten und das Bier trübe machen. Diese Beobachtungen wurden durch GRÖNLUND und WILL teils bestätigt, teils durch neue Beispiele erweitert.

Wie die Schimmelpilze sich gegenüber den Zuckerarten verschieden verhalten können (S. 66, 75, 79), so ergaben die sehr umfangreichen Untersuchungen HANSENs, dass man in dieser Beziehung auch für verschiedene Saccharomyceten und saccharomyces-

ähnlichen Pilze ausgeprägte Charaktere finden kann. Zu den eigentlichen Saccharomyceten schliessen wir hier der Übersicht halber Mycoderma cerevisiae, Sacch. apiculatus, die Torulaformen und Monilia an.

Ebenso ergaben die Untersuchungen BORGMANNs und AMTHORs, dass die chemische Wirksamkeit der Arten auch in anderen Richtungen sehr verschieden sein kann.

HANSEN untersuchte das Verhältnis einer grosen Reihe von Saccharomyceten gegenüber den vier Zuckerarten: Saccharose, Maltose, Lactose und Dextrose.

Seine bekannten sechs Saccharomycesarten (S. cerevisiae I, Sacch. Pastorianus I, II und III, Sacch. ellipsoideus I und II) verhalten sich folgender Weise: Sie entwickeln alle Invertin, verwandeln die Saccharose in Invertzucker und vergären diesen; sie vergären Maltose und Dextrose, dagegen nicht Lactose. Dasselbe Verhältnis gegenüber den vier Zuckerarten zeigen alle die in der Industrie benutzten untergärigen Hefenpilze.

Saccharomyces Marxianus und S. exiguus vergären nicht Maltose und Lactose; sie invertieren Saccharose und vergären Invertzucker- und Dextrose-Nährlösungen.

Saccharomyces membranaefaciens und Mycoderma cerevisiae besitzen kein invertierendes Ferment und vergären nicht die genannten vier Zuckerarten.

Saccharomyces apiculatus invertiert nicht die Saccharose; von den vier Zuckerarten vergärt er nur Dextroselösungen. In Bierwürze ruft er eine schwache Alkoholgärung hervor.

Unter den von HANSEN untersuchten Torulaformen giebt es viele, welche nicht Invertin ausscheiden, Maltose nicht vergären können und in Bierwürze nur ca. 1 Vol.-pCt. Alkohol hervorbringen. Es finden sich doch auch Arten, welche die Saccharose invertieren. In Dextrose-Nährlösungen bringen die verschiedenen Arten mehr oder weniger kräftige Gärungen hervor.

Monilia candida (S. 76—79) besitzt kein invertierendes Ferment, vergärt Saccharose (als Saccharose), Maltose und Dextrose. In Bierwürze bringt sie eine Gärung hervor, erreicht jedoch bei Zimmertemperatur sehr langsam die höheren Alkoholprozente im Vergleich mit den echten Saccharomyceten.

Fassen wir zunächst alle diese verschiedenen Verhältnisse übersichtlich zusammen, so fallen die Saccharomyceten in zwei grosse Gruppen:

I. Solche, die Invertin entwickeln und eine Alkoholgärung hervorrufen. Diese Gruppe spaltet sich wieder in zwei Abteilungen, nämlich
   a) solche, die nicht nur Saccharose und Dextrose, sondern zugleich Maltose kräftig vergären (die sechs ersten HANSENschen Arten und die in der Industrie verwendeten untergärigen Hefenpilze),
   b) solche, die Saccharose und Dextrose aber nicht Maltose vergären (Sacch. Marxianus und Sacch. exiguus).

II. Solche, die nicht Invertin entwickeln und keine Alkoholgärung hervorrufen (Sacch. membranaefaciens).

Die Sprosspilze ohne Endosporenbildung zeigen in Rücksicht auf Inversionsfähigkeit und Gärung die verschiedensten Kombinationen:

I. Die überwiegende Mehrzahl vergären nicht die Maltose. Viele von diesen rufen in Dextrose- und Invertzuckerlösungen mehr oder weniger kräftige Gärungen hervor. Einige (Torulaformen) invertieren Saccharose, viele besitzen kein invertierendes Ferment (Mycoderma cerevisiae, Torulaformen, Sacch. apiculatus)

II. Nur eine Art (Monilia candida) vergärt Maltose sowie Saccharose (direkt) und Dextrose, besitzt aber kein invertierendes Ferment.

Wir lernen hieraus, wie dies HANSEN hervorhebt, dass die Saccharomyceten nicht mehr ohne weiteres als Alkoholgärungspilze charakterisiert werden können. Ferner geben diese Beobachtungen eine Erklärung der Thatsache, dass gerade die Saccharomyceten eine so grosse Bedeutung in der Gärungsindustrie erhalten haben, indem die Mehrzahl dieser Gruppe von Sprosspilzen allein nach den genannten Untersuchungen sowohl im Brauerei- und Brennereibetriebe wie in der Fabrikation von Trauben- und anderen Fruchtweinen benutzt werden können.

Dass aber immer eine Auswahl der geeigneten Art getroffen werden muss, geht mit eben so grosser Evidenz aus diesen Untersuchungen hervor.

Für die analytische Chemie haben diese Verhältnisse der verschiedenen Sprosspilz-Arten eine besondere Bedeutung, wenn die Aufgabe vorliegt, solche Lösungen zu untersuchen, die mehrere verschiedene Zuckerarten enthalten. Ein Beispiel in dieser Richtung giebt die Behandlung der Bierwürze mit solchen Sprosspilzen, welche Maltose nicht vergären können; sie bringen in dieser Nährflüssigkeit etwa 1 Vol.-pCt. Alkohol hervor und geben so einen neuen Beleg dafür, dass es unrichtig ist, mit der ganzen Zuckermenge in der Würze als Maltose zu rechnen.

In der neuesten Zeit hat man auch in der Milch eifrig angefangen, nach Sprosspilzen zu suchen. Von GROTENFELT wurde hier ein Saccharomyces, S. 139, von DUCLAUX und ADAMETZ zwei Nicht-Saccharomyceten, S. 148, entdeckt; sie spalten alle den Milchzucker und sind bisher vergebens in den Brauereien gesucht.

Die verschiedenartige Einwirkung der Saccharomycesarten auf dieselbe Nährflüssigkeit (Bierwürze, Weinmost) unter denselben Verhältnissen wurde ferner von BORGMANN, AMTHOR und MARX studiert.

Die chemischen Wirkungen der zwei Arten Carlsberg Unterhefe Nr. 1 und Nr. 2 auf die Bierwürze sind nach BORGMANNs Untersuchungen ausgeprägt verschieden. Es wurden mit diesen zwei Arten, nachdem sie in einiger Zeit im Gärungsraume gearbeitet hatten und noch hinlänglich von fremden Keimen frei waren, zwei Schiefergärbottiche angestellt, welche dieselbe Würze enthielten, und im Ganzen unter Verhältnissen, die eine wirkliche Comparation ermöglichten. Das Bier wurde wie gewöhnlich gelagert. Die Unterschiede in der chemischen Arbeit traten besonders deutlich hervor in der Menge der freien Säure (in 100 *ccm* in Nr. 1: 0,086, Nr. 2: 0,144, auf Milchsäure berechnet) und in dem Glyceringehalte des Bieres (Nr. 1: 0,109, Nr. 2: 0,137).

BORGMANN macht auf Grundlage dieser Untersuchungen die Bemerkung, dass das Verhältnis zwischen Alkohol und Glycerin bei den zwei Bieren ein anderes als in den sonst untersuchten Bieren ist, indem die früheren Analysen ergaben:

| | Alkohol | Glycerin |
|---|---|---|
| Maximum . . . . | 100 | 5,497 |
| Minimum . . . . . | 100 | 4,140 |

während die Carlsberger Biere die folgenden Verhältnisse zeigten:

| Nr. 1 | | Nr. 2 | |
|---|---|---|---|
| Alkohol | Glycerin | Alkohol | Glycerin |
| 100 | 2,63 | 100 | 3,24 |

Man sieht hieraus, wie auch BORGMANN bemerkt, dass bei tadelloser Herstellung gute Biere erzeugt werden können, bei welchen das Alkohol-Glycerinverhältnis noch unter das früher als zugelassenes Minimum gefundene sinken kann.

Eine Reihe von acht verschiedenen Saccharomyces-Arten, darunter sechs Kulturhefen, alle in absoluten Reinkulturen wurden von AMTHOR mit Rücksicht auf ihre chemische Arbeit in Bierwürze untersucht, und die Resultate zeigen wieder das Berechtigte in dem Prinzipe HANSENs, dass man in der Praxis immer eine Auswahl machen muss. Die Gärungen wurden in PASTEURschen Literkolben ganz unter denselben Umständen geführt und zwar in zwei Reihen, von welchen die erste der Hauptgärung in der Praxis entsprach, die zweite zugleich der Nachgärung. Es wurden in den vergorenen Würzen Alkoholmenge, Extrakt, specifisches Gewicht, Vergärungsgrad, Glycerin, Stickstoff, reduzierende Substanz und Farb-Intensität bestimmt. Die Tabellen zeigen, wie der Verfasser auch bemerkt, greifbare Differenzen in der von den Arten geleisteten chemischen Arbeit. So variierte der Alkoholgehalt der vergorenen Würzen (Vol.-pCt.) innerhalb der Grenzen 4,34 und 6,02 (3,55—5,94 nach der Hauptgärung), die Extraktmenge lag zwischen 8,27 und 11,23 (8,49—12,61 nach der Hauptgärung), der Vergärungsgrad lag zwischen 36,7 und 53,3 (28,8—52,1 nach der Hauptgärung); die Glycerinmenge zeigte sehr auffallende Verschiedenheiten und bewegte sich zwischen 0,0777 und 0,1494; auch zeigten die Mengen des Stickstoffes, der reduzierenden Substanz und zum Teil die Farbintensität erhebliche Unterschiede.

Eine sehr bedeutende Reihe von den Saccharomyceten, welche in Weinmost vorkommen, wurden von MARX sowohl botanisch als auch in Betreff ihrer chemischen Wirkungen auf die Nährflüssigkeit untersucht, nachdem sie alle in absoluten Reinkulturen nach HANSENs Methode dargestellt waren. Die Zeit für die Sporenbildung war sehr verschieden, auch die Zahl der sporenbildenden Zellen und die Zahl der Sporen in den einzelnen Zellen zeigten augenfällige und konstante Differenzen. In dieser

Verbindung ist es namentlich von Interesse, dass die reingezüchteten Arten deutliche Unterschiede im Gärungsvermögen zeigten, ferner in der Fähigkeit flüchtige Stoffe hervorzubringen, welche dem Weine ein besonderes Bouquet verleihen, und endlich in der Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen Säuren und höheren Temperaturen. Da die Geschmacksdifferenzen bei nicht wenigen Arten stark hervortraten, so hebt MARX mit Recht die praktische Anwendung solcher Untersuchungen hervor, indem es hierdurch möglich sei, durch Zusatz von Hefen mit bekannten Eigenschaften zu sterilisierten Weinmosten unabhängig von dem Orte Weine mit bestimmten Eigentümlichkeiten im Geschmack u. s. w. hervorzubringen.

f) Über Variationen bei den Saccharomyces-Arten.

Die zahlreichen Untersuchungen HANSENs haben ergeben, dass die Saccharomyceten in verschiedener Weise den äusseren Einflüssen gegenüber reagieren; mit voller Berechtigung können, nach den in den vorigen Abschnitten niedergelegten Resultaten, eine Reihe von nicht nur sogenannten wilden Hefenarten, sondern auch wohl charakterisierter Ober- und Unterhefearten, die in der Praxis Verwendung fanden, aufgestellt werden. Von grossem praktischen Interesse ist es, dass die Arten in Kulturen mit Bierwürze, welche mehrere Jahre ununterbrochen fortgesetzt wurden, keine oder nur kleine Schwankungen zeigten. Gleichzeitig damit aber, dass HANSEN zu diesen Resultaten mittels seiner absoluten Reinkulturen kam, fand er, dass es durch geeignete Behandlung verhältnismässig leicht ist, vorläufige, in verschiedener Richtung oft tief eingreifende Variationen hervorzurufen; auch die individuellen Eigentümlichkeiten der Zellen in einer absoluten Reinkultur können sich hier geltend machen. Solche Veränderungen sind doch nur vorübergehend; bei passender Züchtung verschwinden sie wieder, und die Art kehrt zu ihrem ursprünglichen Zustande zurück.

Wie bekannt, sind die Zeitangaben für das Auftreten der ersten Sporenanlagen bei den oben beschriebenen sechs Arten von der bestimmten Voraussetzung bedingt, dass die Vegetation vorher in 24 Stunden bei ca. 25° C. in Würze kultiviert wird. Schon gleichzeitig damit, dass HANSEN die Temperaturkurven für

diese sechs Arten publizierte (1883), fand er, dass die Vegetation, wenn sie sich in zwei Tagen statt in einem bei der genannten Temperatur in Würze entwickelt hat, dann langsamer und spärlicher als sonst seine Sporen entwickelt. Behandelt man sie aber danach in Würze in der erst beschriebenen Weise, so tritt das normale Verhältnis wieder ein. Hier haben wir also ein Beispiel einer sehr schwach eingreifenden Variation.

In einer Gelatinekultur der „Carlsberg Unterhefe Nr. I" findet man oft sowohl eiförmige wie gestreckte, wurstförmige Zellen, so dass man nach REESS glauben müsste, man hätte zwei Arten. Führt man Kolonieen beiderlei Art, jede für sich, in Kolben mit Würze hinein, so erhält man auch hier teils Vegetationen mit eiförmigen, teils mit „Pastorianen" Zellen. HANSENs Versuche zeigten, dass die letztgenannte Vegetation, in neuen Kolben fortgesetzt, in längerer Zeit die wurstförmigen Zellen zum Teil behält; in den Hefepropagierungs-Apparat hineingeführt, zeigte die Vegetation noch eine Beimischung solcher Zellen; wenn die Hefe aber davon in einen gewöhnlichen Gärbottich eingebracht wurde, verschwanden sie. Die Variation ist also in diesem Falle stärker eingreifend; sie hört erst auf, nachdem die Hefe in einer Reihe von Gärungen fortgepflanzt worden ist.

Ein anderes Beispiel in derselben Richtung ist dieses, dass eine Sacch. cerevisiae (Unterhefe), welche nach längerer penibler Entwickelung danach in Würze bei ca. 27° C. propagiert wurde, Zellen mit dem gewöhnlichen Aussehen erhielt, während sie, bei $7^1/_2$° C. kultiviert, zusammengewickelte Kolonieen mit myceliumartigen Verzweigungen gab. Man hat hier ein interessantes Beispiel von der formgebenden Fähigkeit der Temperatur.

Als Beispiel einer bedeutend stärker eingreifenden Veränderung in der Natur der Zellen können die Beobachtungen HANSENs über Sacch. Ludwigii genannt werden. Wenn die einzelnen Individuen einer absoluten Reinkultur jedes für sich wieder reingezüchtet werden, so kann man Vegetationen erhalten, welche eine sehr verschiedene Fähigkeit zur Sporenbildung zeigen. Durch planmässige Auswahl der einzelnen Zellen gelang es HANSEN solche Vegetationen hervorzubringen, die unter

den bekannten Umständen gar nicht Sporen hervorbrachten; und umgekehrt zeigte sich, wenn er, von derselben ursprünglichen Vegetation ausgehend, einen Hefenfleck auswählte, welcher von einer sporentragenden Zelle stammte und diesen Fleck weiter entwickelte, dass er dann eine Vegetation erhielt, welche sogleich befähigt war, reichliche Sporen zu entwickeln. Durch solche planmässige Auswahl wurde diese Art in drei Vegetationsformen gespaltet, von welchen die eine sich durch ihre kräftige Sporenbildung auszeichnete, die andere dadurch, dass diese Fähigkeit beinahe verschwunden war, und die dritte bildete nicht länger Sporen. Nach zahlreichen Züchtungen in Würze kehrte doch auch die dritte Form zur Sporenbildung zurück, obzwar langsam; wenn er sie aber in Dextroselösung mit Hefewasser kultivierte, so trat diese Fähigkeit augenblicklich ein.

Ein anderes Beispiel physiologischer Umbildung ist dieses: Die drei unter der Gruppe Saccharomyces Pastorianus von ihm beschriebenen Arten bilden unter gewissen Bedingungen einen teigartigen Bodensatz, den der übrigen Saccharomyceten ähnlich, unter anderen Bedingungen dagegen einen hautartig gefalteten oder einen käseartigen Bodensatz aus kleinen Klümpchen bestehend (PASTEURs levûre caséeuse), also Bodensätze von höchst verschiedenem Aussehen, und doch sind sie von denselben Arten gebildet. Im letztgenannten Falle erhält auch die gärende Würze ein ganz eigentümliches Aussehen, indem sie nämlich während der Gärung im Gegensatze dazu, was sonst stattfindet, fortwährend glänzend hell bleibt, so dass man deutlich beobachten kann, wie die Hefeflocken vom Boden aus zur Oberfläche emporsteigen und dann wieder zurücksinken. Nach fortgesetzten neuen Gärungen mit Würze kann man diesen eigentümlichen Bodensatz wieder in einen teigartigen umbilden.

In dieser Verbindung müssen auch die Hautbildungen der Saccharomyceten genannt werden, welche in der Abteilung über Systematik der Saccharomyceten behandelt wurden.

Im Anfange dieses Jahres teilte HANSEN eine Reihe von Experimenten mit (Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Bd. V, 1889, S. 665), welche darauf hinausgehen, die Bedingungen für die Variation zu entdecken und auf experimentellem Wege neue Rassen und wenn möglich neue Species

darzustellen. Diese Studien werden in seinem Laboratorium fortgesetzt. Das Folgende findet sich teils in der genannten Publikation, teils rührt es von seiner mündlichen Mitteilung her.

Für mehrere Saccharomycesarten fand er, dass sie, wenn ihre Zellen längere Zeit hindurch in gelüfteter Bierwürze in der Nähe ihres Temperaturmaximums gezüchtet waren, derartig beeinflusst wurden, dass sie ihr Vermögen, Sporen zu bilden, verloren, und zwar in der Weise, dass dies auch immer der Fall war mit den zahllosen, in neuen Kulturen bei dem Temperaturoptimum nach und nach gebildeten Generationen. Doch hatten die Zellen ein kräftiges Aussehen und wurden unter vielfach variierten Bedingungen weiter gezüchtet.

Eine entsprechende Behandlung von Sacch. Ludwigii bewirkte nur, dass die Zellen teilweise diese Fähigkeit verloren, so dass sie, während sie vor dieser Behandlung schnell eine reichliche Sporenbildung gaben, jetzt nur langsam und in geringem Grade solche Vermehrungsorgane entwickelten. Diese Fähigkeit war also hier in hohem Grade eingeschränkt worden. So lange sie in Würze kultiviert wurden, hielten die Vegetationen sich auf diesem Standpunkte; wurden sie aber in einer Lösung von Dextrose in Hefewasser kultiviert, dann gingen sogleich Kulturen hervor, die wieder mit grösserer Leichtigkeit Sporen entwickelten.

Die Ursache zu diesen tief eingreifenden Umbildungen ist nicht allein darin zu suchen, dass bei der hohen Temperatur unter fortwährender Lüftung neue Generationen entwickelt werden, sondern namentlich in der chemischen Zusammensetzung der Nährflüssigkeit.

Für andere Arten gelang es bisher nicht, die oben beschriebenen Umbildungen hervorzurufen.

Diese Untersuchungen werden auch in die Industrie eingreifen, obgleich in anderer Weise als die früheren Arbeiten HANSENs. Unter den Arten, welche durch die oben angeführte Behandlungsweise die Fähigkeit zur Sporenbildung verlieren, gehört auch die in der Brauerwelt wohl bekannte Carlsberg-Unterhefe Nr. 2. Für diese Rasse wurde jetzt durch zahlreiche Versuche nachgewiesen, dass gleichzeitig mit der genannten Umbildung auch in anderen Richtungen Umbildungen im Plasma der Zellen vor sich gehen. Die neugebildete Vegetation giebt eine

schwächere Vergärung, indem sie langsamer als sonst die höheren Alkoholprozente erreicht; sie arbeitet, kurz gesagt, in anderer Weise, nachdem sie der beschriebenen Behandlung unterworfen wurde als bevor.

Es kann gegen die Auffassung kein Einwand gemacht werden, dass wir hier möglicherweise der Bildung neuer Arten gegenüber stehen. Wir wissen ja, dass die Art nicht diese erstarrte, unveränderliche Grösse ist, wie man es zur Zeit LINNÉs allgemein annahm, sondern dass die Artenmerkmale nur unter bestimmten Bedingungen konstant sind. Zur vollständigen Aufklärung dieser wichtigen und schwierigen Probleme gehören indessen durch lange Zeiten fortgesetzte und in verschiedener Weise variierte Versuche.

Um Missverständnissen vorzubeugen, dürfte es nicht überflüssig sein, hier daran zu erinnern, dass die oben beschriebenen merkwürdigen Umbildungen nur durch ein in längerer Zeit dauerndes gewaltsames Eingreifen in die Lebensprozesse der betreffenden Zellen hervorgerufen wurden, und dass sie nicht vorkommen, so lange die Entwickelung in normaler Weise vor sich geht.

Ein Beispiel davon, wie stark die Saccharomyceszelle unter normalen Verhältnissen auf ihre Fähigkeit zur Sporenbildung festhält, finden wir in den Brauereien und Brennereien. Hier haben die Kulturhefenarten Jahrhunderte hindurch fortgelebt und unendliche Generationen unter solchen Verhältnissen entwickelt, die ihnen als Regel nicht erlaubt haben, die genannte Funktion in Anwendung zu bringen, und doch haben sie diese Fähigkeit immer hartnäckig festgehalten.

### g) Die gelatinöse Bildung bei den Sprosspilzen.

Unter gewissen noch nicht genauer bekannten Umständen können die durch Sprossung der Hefezellen hervorgebrachten Kolonieen sich zu unregelmässigen Klümpchen vereinigen, welche schneller als die einzelnen Hefezellen zu Boden sinken (Bruch und Klärung in den Brauereien). Dies steht unzweifelhaft in Verbindung mit einer Seite der Entwickelung der Hefezelle, welche HANSEN in 1884 entdeckte. Er fand, dass sowohl die Saccharomyceten wie andere Sprosspilze ein gelatinöses Netzwerk ausscheiden können, welches durch Präparation sich als Stränge oder

Platten zeigt und worin die Zellen eingebettet liegen (Fig. 24 *A B*). Bringt man z. B. etwas dickflüssige Brauereihefe in ein Glas und stellt sie zugedeckt hin, so dass sie langsam eintrocknet, dann wird eine Spur dieser Hefe, in einem Tropfen Wasser verteilt, dieses Netzwerk deutlich zeigen (Fig. 24 *A*). Die Bildung tritt gleichfalls auf in den Gips- und Gelatinekulturen. Ich selbst habe

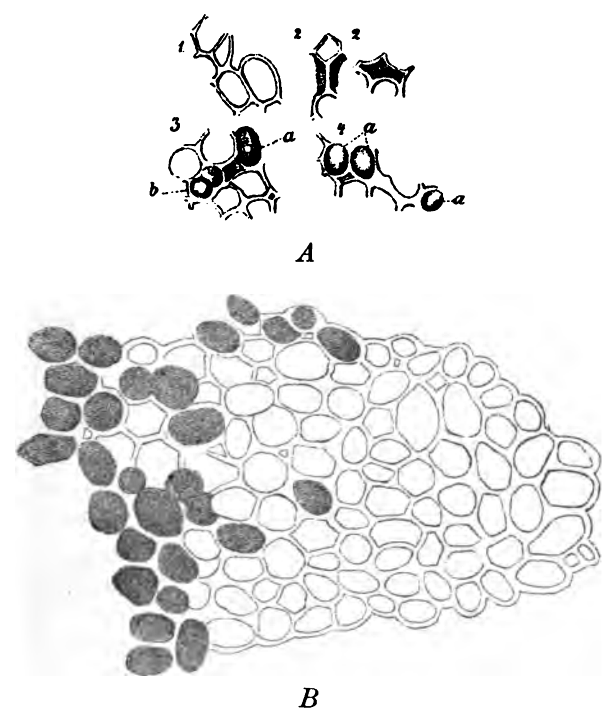



Fig. 24.

$^{1000}/_{1}$. Hefezellen mit Bildung des gelatinösen Netzwerkes nach HANSENS Zeichnung.

*A* Das Netzwerk ist durch ein teilweises Trocknen dargestellt. 1 Partie von Strängen gebildet, deren Zellen herausgefallen sind; 2 und 3 zeigen, dass das Netzwerk zugleich als ganze Wände auftreten kann; eine solche Bildung befindet sich zwischen *a* und *b*; *a* ist eine vegetative Zelle, *b* eine Zelle mit zwei Sporen; in 4 sieht man bei *a* drei im Netzwerke eingelagerte Zellen *B* Netzwerkbildung und Hefezellen. Diese letzteren wurden durch Methylviolett gefärbt. Das Netzwerk ist ungefärbt. Einige Hefezellen liegen noch in den Maschen; die meisten sind ausgetreten.

diese merkwürdige Bildung, nachdem HANSEN mich auf ihre Natur aufmerksam gemacht hatte, sehr häufig in den Hefeproben beobachtet, welche in Filtrierpapier im Briefcouvert meinem Laboratorium geschickt wurden[1]). Sie wurde von HANSEN auch in der Hautbildung der allermeisten Arten gefunden. Eine gewöhnliche mikroskopische Untersuchung der Anstellhefe in der Brauerei zeigt diese Bildung nicht; mit Hilfe von Färbungen tritt sie jedoch deutlich hervor (Fig. 24*B*). Wenn die Hefe wiederholt ausgewaschen wurde, so gelang es auch nicht durch Färbungen, das Netzwerk hervorzurufen; entfernte man aber das Wasser und liess die Zellmasse einige Zeit hindurch stehen, so konnte eine entsprechende Präparation die gelatinösen Massen wieder deutlich machen. Durch Variieren der Ernährungsverhältnisse der Zellen konnte die Entwickelung gefördert oder gehemmt, die chemische Zusammensetzung geändert werden. Das ganze Verhältnis erinnert an die Zoogloeenbildung bei den Bakterien.

---

Als Einleitung zur systematischen Beschreibung der einzelnen Saccharomycesarten geben wir nachstehend eine allgemeine Beschreibung der Saccharomyces-Zelle.

Das mikroskopische Bild einer Hefezelle, wie sie sich am häufigsten in einer gärenden Flüssigkeit zeigt, ist eine kugelförmige oder ovale Figur, welche durch Ausstülpung ihrer Wand eine oder mehrere Knospen hervorbringt, die sich früher oder später von der Mutterzelle lostrennen können. Diese Zelle ist folglich von einer Membran umgeben, welche in den verschiedenen Entwickelungsstadien der Zelle sich etwas verschieden ausbilden kann, doch selten in augenfälliger Weise. Anders verhält sich dagegen der Inhalt dieser Zelle. Das einfachste Bild dieses Inhalts erhalten wir, wenn wir die Zelle in ihrer kräftigsten Vermehrungswirksamkeit betrachten: Der Inhalt besteht dann aus klarem und homogenem Plasma. Mit der fortschreitenden Vermehrungs- und Gärungswirksamkeit treten in diesem Plasma

---

1) Diese Methode, eine Hefeprobe für längere Zeit aufzubewahren, ist sehr bequem. Man zieht ein Stückchen Filtrierpapier einigemale schnell durch die Flamme, giesst darauf ein paar Tropfen Hefe und faltet es zusammen, wonach es in mehrere ähnlich behandelte Schichten eingelegt wird.

verschiedene Körper auf; teils klare Partieen, welche safterfüllt sind (Vakuolen), teils grössere und kleinere Körner, von welchen einige als Fettkörner bestimmt werden können, während andere eine dem Plasma ähnliche Beschaffenheit zeigen. Diese körnige Beschaffenheit des Plasmas nimmt nach und nach zu, und in einem weit vorgeschrittenen Gärungsstadium, wenn die Zelle in einen beinahe ruhenden Zustand übergegangen ist, kann das Plasma zu einem feinen Belege an der inneren Seite der Wand reduziert sein, während der übrige Raum von einer grossen Vakuole erfüllt wird, die zahlreiche kleine und grosse Körner enthält, unter welchen sehr viele fettartig sind. Bringt man solche Zellen wieder in eine gärungsfähige Flüssigkeit, dann zeigen sie nach kurzer Zeit ein höchst charakteristisches Bild in der Periode, welche den makroskopisch erkennbaren Gärungsphönomenen vorhergeht. Die Körner verschwinden und in dem klaren Zellsaft treten zahlreiche feine Plasmafäden auf, die nach und nach abgerundete Vakuolen umgrenzen; endlich verschwinden diese und die Zelle ist wieder mit einem klaren, homogenen Plasma gefüllt.

Wie in den meisten übrigen Pflanzenzellen ist auch in der Hefezelle ein Zellkern gefunden (von SCHMITZ zuerst entdeckt), welcher durch eine Färbung mit Osmiumsäure oder Pikrinsäure — Hämatoxylin nachgewiesen werden kann. Nach HANSEN ist dieser Zellkern entweder kugel- oder scheibenförmig; er fand in den alten Hautbildungen von Saccharomyceten Zellen, welche ohne alle Präparation den Zellkern deutlich zeigten.

Von den endogenen Sporen sowie von den gelatinösen Bildungen wurde bereits früher gesprochen.

## Systematik der Gattung Saccharomyces.

**Sprosspilze**, in den meisten Fällen ohne Mycelbildung, deren einzelne Arten mit Zellen verschiedener Form und Grösse auftreten. Bei gewisser Behandlung, auch zuweilen ohne vorhergehende Präparation, zeigen sich Zellkerne. Unter bestimmten Bedingungen entwickeln die Zellen **endogene Sporen**; die keimenden Sporen wachsen zu sprossenden Zellen aus. Anzahl der Sporen 1—10,

am häufigsten 1—4. Die Zellen scheiden, unter geeigneten Verhältnissen, ein gelatinöses Netzwerk aus, worin Zellkomplexe eingebettet sind.

Die Mehrzahl der Arten rufen eine Alkoholgärung hervor.

### Saccharomyces cerevisiae I. Hansen[1]).

(Fig. 25—27.)



Fig. 25. Bodensatzformen nach HANSEN.

Fig. 26. Hautformen bei 15—16° C. nach HANSEN.

Diese und die folgenden fünf Arten (Sacch. Past. I, II und III, Sacch. ellips. I und II) entwickeln alle Invertin; sie bilden hierdurch die Saccharose zu Invertzucker um und vergären diesen. Sie vergären Dextrose kräftig; ebenso Maltoselösungen, namentlich wenn etwas Nährflüssigkeit, z. B. Hefewasserextrakt, zugefügt wird. Sie sind alle kräftige Alkoholgärungspilze, welche in Bierwürze bei Zimmertemperatur im Laufe von 14 Tagen leicht 4—6 Vol.-pCt. Alkohol geben. In Laktose können sie keine Gärung hervorbringen.

Saccharomyces cerevisiae I ist eine obergärige Hefe.

Die in Würze entwickelte Vegetation von Bodensatzhefe (Fig. 25) besteht wesentlich aus grossen, runden oder ovalen Zellen; eigentlich in die Länge gestreckte Zellen treten unter diesen Verhältnissen nicht auf.

---

1) Diese obergärige Hefe darf nicht mit HANSENS Carlsberg Unterhefe Nr. 1 verwechselt werden.

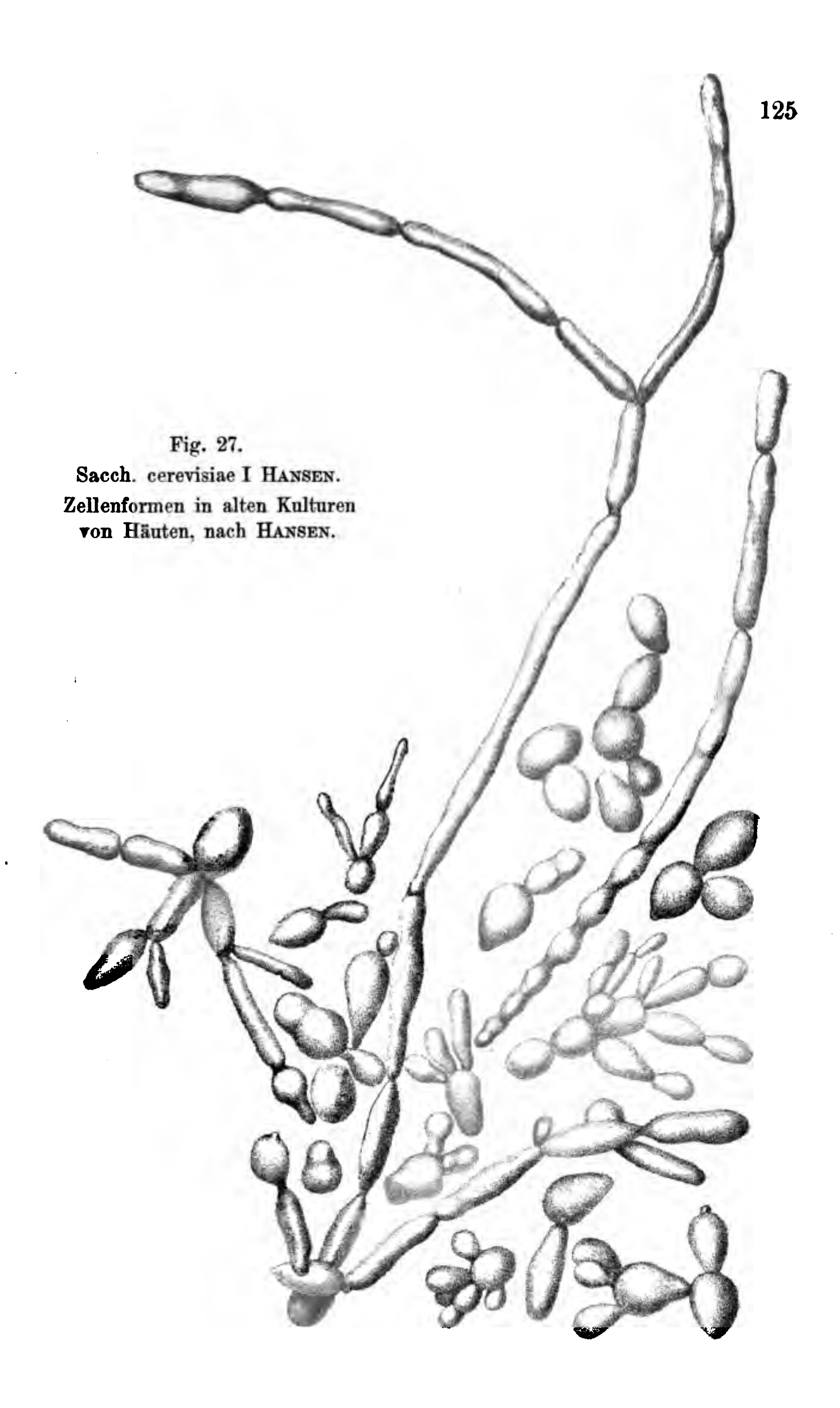


Fig. 27.
**Sacch.** cerevisiae I HANSEN.
**Zellenformen in alten Kulturen von Häuten, nach HANSEN.**

Alte englische obergärige Hefe, welche in den Brauereien Edinburghs und Londons benutzt wird.

Modus der Askosporenbildung (Fig. 23, 1): [1])

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Bei | $37^{1}/_{2}$ | ° C. | entwickeln sich keine Askosporen. | |
| „ | 36—37 | „ | zeigen sich die ersten Anlagen nach | 29 Stunden |
| „ | 35 | „ | „ „ „ „ „ „ | 25 „ |
| „ | $33^{1}/_{2}$ | „ | „ „ „ „ „ „ | 23 „ |
| „ | 30 | „ | „ „ „ „ „ „ | 20 „ |
| „ | 25 | „ | „ „ „ „ „ „ | 23 „ |
| „ | 23 | „ | „ „ „ „ „ „ | 27 „ |
| „ | $17^{1}/_{2}$ | „ | „ „ „ „ „ „ | 50 „ |
| „ | $16^{1}/_{2}$ | „ | „ „ „ „ „ „ | 65 „ |
| „ | 11—12 | „ | „ „ „ „ „ „ | 10 Tagen |
| „ | 9 | „ | entwickeln sich keine Askosporen. | |

Sporen stark lichtbrechend. Wand der Sporen sehr deutlich. Grösse der Sporen $2^{1}/_{2}$—6 $\mu$.

Hautbildung:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Bei | 38° C. | trat keine Hautbildung auf. | | | | |
| „ | 33—34 „ | fanden sich nach | 9—18 | Tagen | | schwach entwickelte Hautflecke. |
| „ | 26—28 „ | „ „ „ | 7—11 | „ | | „ „ „ |
| „ | 20—22 „ | „ „ „ | 7—10 | „ | | „ „ „ |
| „ | 13—15 „ | „ „ „ | 15—30 | „ | (Fig. 26) | „ „ |
| „ | 6— 7 „ | „ „ „ | 2— 3 | Monaten | (Fig. 26) | „ „ |
| „ | 5 „ | trat keine Hautbildung auf. | | | | |

Mikroskopisches Bild der Zellen in den Häuten:

Bei 20—34° C.: Kolonieen häufig; wurstförmige und barock gestaltete Zellen treten auf.

Bei 15— 6° C. (Fig. 26): Der grösste Teil der Zellen wie die der Aussaat geformt; einzelne abweichende Formen.

In alten Kulturen von Häuten treten alle Zellformen auf, bis zu sehr stark gestreckten myceliumähnlichen (Fig. 27).

---

1) Die Vorbereitung der Vegetation für diese Untersuchungen muss in folgender Weise geschehen: Nachdem die Zellen in einiger Zeit in gewöhnlicher Bierwürze (ca 14 pCt. Ball.) bei Zimmertemperatur kultiviert worden sind, werden junge kräftige Zellen von dieser Kultur in neue Würze derselben Beschaffenheit eingeführt und hier in ca. 24 Stunden bei 25—27° C. entwickelt. Diese Vegetation wird dann auf die Gipsblöcke übergeführt. Dasselbe hat auch seine Gültigkeit für die übrigen Arten.

## Saccharomyces Pastorianus I. Hansen.

(Fig. 28, 29.)

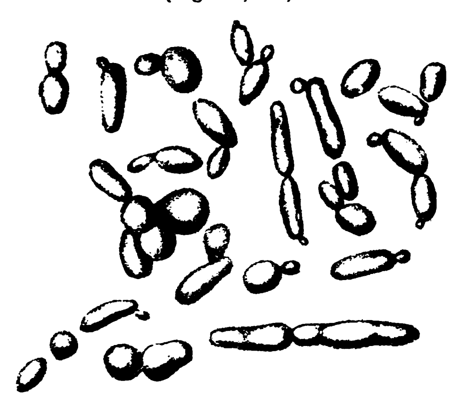


Fig. 28. Bodensatzformen nach HANSEN.

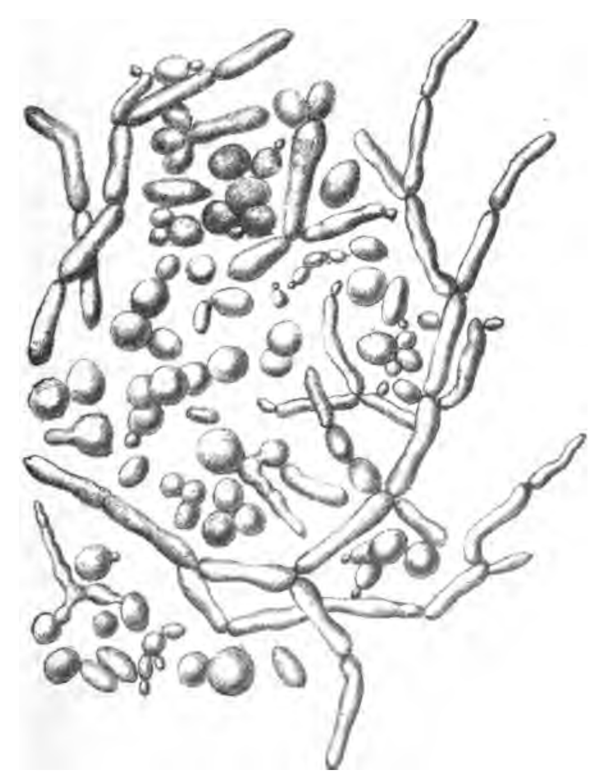


Fig. 29. Hautformen bei 13—15° C. nach HOLMS Abbildungen in HANSENS Abhandlung.

Untergärig.

Bodensatzformen in Würze entwickelt: Vorwiegend gestreckte, wurstförmige, auch grosse und kleine ovale und runde Zellen (Fig. 28).

Kommt in der Luft der Gärungsräume häufig vor. Verleiht dem Biere einen unangenehmen bitteren Geschmack.

Modus der Askosporenbildung (Fig. 23, 2):

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Bei | $31^1/_2$° C. | entwickeln sich keine Askosporen. | | |
| „ | $29^1/_2$—$30^1/_2$ „ | zeigen sich die ersten Anlagen nach | 30 | Stunden |
| „ | 29 „ | „ „ „ „ „ „ | 27 | „ |
| „ | $27^1/_2$ „ | „ „ „ „ „ „ | 24 | „ |
| „ | $23^1/_2$ „ | „ „ „ „ „ „ | 26 | „ |
| „ | 18 „ | „ „ „ „ „ „ | 35 | „ |
| „ | 15 „ | „ „ „ „ „ „ | 50 | „ |
| „ | 10 „ | „ „ „ „ „ „ | 39 | „ |
| „ | $8^1/_2$ „ | „ „ „ „ „ „ | 5 | Tagen |
| „ | 7 „ | „ „ „ „ „ „ | 7 | „ |
| „ | 3—4 „ | „ „ „ „ „ „ | 14 | „ |
| „ | $^1/_2$ „ | entwickeln sich keine Askosporen. | | |

Grösse der Sporen $1^1/_2$—5 $\mu$.

Hautbildung:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Bei | 34° C. | tritt keine Hautbildung auf. | | |
| „ | 26—28 „ | fanden sich nach | 7—10 Tagen | schwach entwickelte Hautflecke. |
| „ | 20—22 „ | „ „ „ | 8—15 „ | „ „ „ |
| „ | 13—15 „ | „ „ „ | 15—30 „ | (Fig. 29) „ „ |
| „ | 6— 7 „ | „ „ „ | 1— 2 Monaten | (Fig. 29) „ „ |
| „ | 3— 5 „ | „ „ „ | 5— 6 „ | wie Fig. 29, doch ohne die grossen Kolonieen. |
| „ | 2— 3 „ | tritt keine Hautbildung auf. | | |

Mikroskopisches Bild der Zellen in den Häuten:

Bei 20—28° C.: Beinahe dieselben Formen wie im Bodensatze.

Bei 13—15° C.: Stark entwickelte, myceliumartige Kolonieen von sehr gestreckten, wurstförmigen Zellen (Fig. 29) ziemlich häufig.

In alten Kulturen von Häuten sind die Zellen kleiner als im Bodensatze; es treten sehr barocke, bisweilen fast fadenförmige Zellen auf.

## Saccharomyces Pastorianus II. Hansen.

(Fig. 30, 31.)

Schwach obergärig.

Bodensatzformen in Würze entwickelt: Vorwiegend gestreckte, wurstförmige, auch grosse und kleine ovale und runde Zellen (Fig. 30).

Kam in HANSENs Luftanalysen in der Brauerei häufig vor; scheint zu den Arten zu gehören, die im Biere keine Krankheiten hervorrufen.

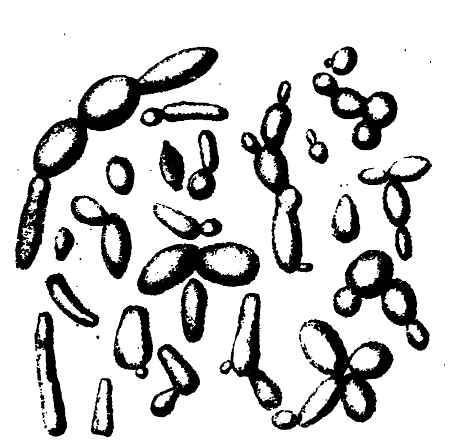


Fig. 30.
Bodensatzformen nach HANSEN.

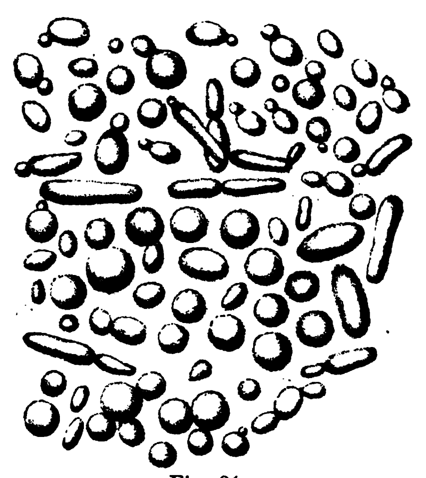


Fig. 31.
Hautformen bei 15—3° C. nach HOLMS Abbildungen in HANSENS Abhandlung.

Modus der Askosporenbildung (Fig. 23, 3):

| | | | |
|---|---|---|---|
| Bei | 29 | ° C. | entwickeln sich keine Askosporen. |
| „ | 27—28 | „ | zeigen sich die ersten Anlagen nach 34 Stunden |
| „ | 25 | „ | „ „ „ „ „ „ 25 „ |
| „ | 23 | „ | „ „ „ „ „ „ 27 „ |
| „ | 17 | „ | „ „ „ „ „ „ 36 „ |
| „ | 15 | „ | „ „ „ „ „ „ 48 „ |
| „ | $11^1/_2$ | „ | „ „ „ „ „ „ 77 „ |
| „ | 7 | „ | „ „ „ „ „ „ 7 Tagen |
| „ | 3—4 | „ | „ „ „ „ „ „ 17 „ |
| „ | $^1/_2$ | „ | entwickeln sich keine Askosporen. |

Grösse der Sporen 2—5 μ.

Hautbildung:

Bei 34° C. tritt keine Hautbildung auf.
„ 26—28 „ finden sich nach 7—10 Tagen schwach entwickelte Hautflecke.
„ 20—22 „ „ „ „ 8—15 „ „ „ „
„ 13—15 „ „ „ „ 10—25 „ }
„ 6— 7 „ „ „ „ 1— 2 Monaten } (Fig. 31) „ „
„ 3— 5 „ „ „ „ 5— 6 „ }
„ 2— 3 „ tritt keine Hautbildung auf.

Mikroskopisches Bild der Zellen in den Häuten:

Bei 20—28° C.: Beinahe dieselben Formen wie im Bodensatze; dazu barocke, wurstförmige Zellen.
Bei 15 — 3° C.: Überwiegend ovale und runde Zellen.

In alten Kulturen von Häuten sind die Zellen kleiner als im Bodensatze; es treten sehr barocke, bisweilen fast fadenförmige Zellen auf.

In Hefewasser-Gelatine geben Strichkulturen dieser Art bei 15° C. nach 16 Tagen Vegetationen mit ziemlich glatten Rändern, hierdurch auch verschieden von der nächsten Art.

## Saccharomyces Pastorianus III. Hansen.

(Fig. 32, 33.)

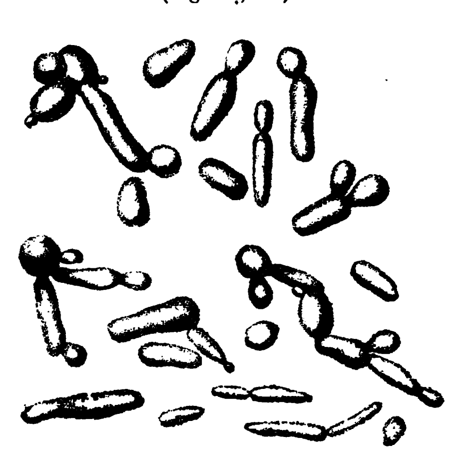


Fig. 32.
Bodensatzformen nach Hansen.

Obergärig.

Bodensatzformen in Würze entwickelt: Vorwiegend gestreckte, wurstförmige, auch grosse und kleine ovale und runde Zellen (Fig. 32).

Wurde von untergärigem, hefetrübem Bier ausgeschieden und ist von HANSEN als eine der biertrübenden Arten bestimmt worden.

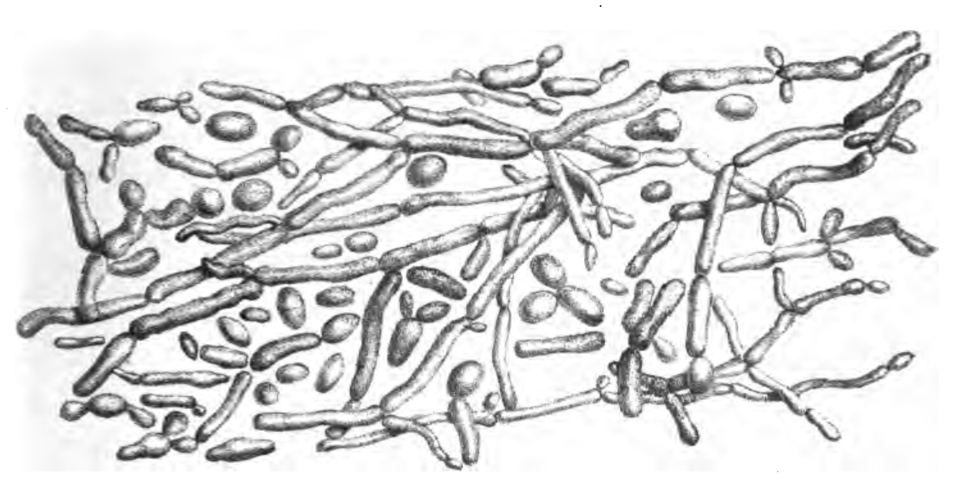


Fig. 33.

Hautformen bei 15 – 3° C. nach HANSEN.

Modus der Askosporenbildung (Fig. 33, 4):

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bei | 29 | ° C. | entwickeln sich keine Askosporen. | | | | | | | |
| „ | 27—28 | „ | zeigen | sich | die | ersten | Anlagen | nach | 35 | Stunden |
| „ | 26½ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 30 | „ |
| „ | 25 | „ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 28 | „ |
| „ | 22 | „ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 29 | „ |
| „ | 17 | „ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 44 | „ |
| „ | 16 | „ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 53 | „ |
| „ | 10½ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 7 | Tagen |
| „ | 8½ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 9 | „ |
| „ | 4 | „ | entwickeln sich keine Askosporen. | | | | | | | |

Grösse der Sporen 2—5 $\mu$.

nicht die Saccharose. Er wurde im Schleimflusse auf Ulmenwurzeln gefunden und hat eine ziemlich grosse Ähnlichkeit mit den Mycoderma cerevisiae- und Mycoderma vini-Arten, ist aber ein echter Saccharomycet.

### Saccharomyces Hansenii Zopf.

Dieser Saccharomycet wurde von ZOPF unter den Pilzen des Baumwollsaatmehles entdeckt. Er bildet kugelige Sporen von sehr geringem Durchmesser (2—4 $\mu$), welche meistens in der Einzahl, höchstens zu zwei in einer Mutterzelle entwickelt werden. In gärfähigen, zuckerhaltigen Nährlösungen ruft er keine Alkoholgärung hervor, dagegen beobachtet man im Bodensatze der Kolben Krystalle von oxalsaurem Kalk. ZOPF fand solche Bildungen in Nährlösungen mit Galactose, Traubenzucker, Rohrzucker, Milchzucker, Maltose, Dulcit, Glycerin und Mannit.

### Saccharomyces Ludwigii Hansen.

Diese eigentümliche Art, welche im Schleimflusse lebender Eichen von LUDWIG entdeckt wurde, ist unter den bisher bekannten Saccharomyceten die einzige, welche man mittels der mikroskopischen Untersuchung für sich allein zu kennen imstande ist. Im nachfolgenden gebe ich eine Beschreibung nach HANSENs Untersuchungen. Die Zellen haben eine sehr variable Grösse und sind elliptisch, flaschenförmig, wurstförmig oder häufig citronenförmig. In allen Zellenkomplexen können Scheidewände auftreten. Die Vegetationsflecken in Würzegelatine sind — wie die der allermeisten Saccharomyceten — rund, hellgrau oder schwach gelblich. In Würze bildet der Pilz selbst nach sehr langer Gärungsdauer nur 1,2 Vol.-pCt. Alkohol; in Übereinstimmung hiermit wird Maltose von dieser Art nicht vergoren. In Dextroselösungen wurden dagegen bis zu 10 Vol.-pCt. Alkohol gebildet. Saccharoselösungen werden invertiert; in Lactose- und Dextrinlösungen bewirkt er keine Gärung und in Stärkewasser keine Zuckerbildung. Diese Art entwickelt in wässerigen Saccharoselösungen Sporen, welches bei anderen Saccharomyceten nicht der Fall war; auch in der Würzegelatine sowie im Hefewasser und in Würze werden leicht Sporen gebildet, im letzten Falle auch wenn noch keine Haut gebildet ist.

Sehr charakteristisch für diese Art ist auch, dass die Zellen in wässeriger Saccharoselösung schon binnen zwei Jahren absterben, während alle anderen von HANSEN bisher untersuchten Saccharomyceten sich viel länger in dieser Flüssigkeit lebendig erhalten können.

In alten Kulturen sind starke Anläufe zur Mycelbildung häufig, aber nur ausnahmsweise findet man Partieen, deren Glieder mit einander fest verbunden sind und nur schwache Einschnürungen zeigen; diese Partieen sind mit deutlichen, geraden Querwänden ausgestattet. Jede Zelle solcher Kolonieen kann sowohl Sprossen wie Sporen bilden. Man findet mitunter auch barocke Zellen und sehr grosse, stark verzweigte Zellen.

Für die Sporenbildung ist eine Temperatur von ca. 25° C. günstig; wie oben gesagt, findet sie auch statt, wenn Nahrung vorhanden ist.

### Saccharomyces acidi lactici Grotenfelt.

Unter diesem Namen beschreibt GROTENFELT einen Saccharomyces, welcher, auf sterilisierte Milch übertragen, eine intensive Gerinnung unter Säurebildung hervorruft; er bildet auf Gelatine und Agar porzellanartig glänzende, weisse Kolonieen, auf Kartoffeln breite, feuchte, weissgraue, bald braun werdende Rasen. In Gelatine-Stichkulturen strecken sich vom Impfstiche aus kurze, kolbenförmige Austreibungen in die Gelatine. Die Zellen sind ellipsoidisch; Länge 2,0—4,35 $\mu$, Dicke 1,50—2,90 $\mu$.

Bei Verimpfung auf Milchzuckerlösung mit Zusatz von kohlensaurem Kalk konnte im Destillat Alkohol nachgewiesen werden. Auf neutralisierte 3 prozentige Milchzuckerlösung übertragen bildete Saccharomyces acidi lactici innerhalb 8 Tagen 0,108 pCt. Säure.

### Saccharomyces minor Engel.

Die vegetativen Zellen sind vollständig sphärisch, bis zu 6 $\mu$ im Diameter, in Ketten oder wenigzelligen Flöckchen (6—9) vereinigt. Sporenbildende Zellen 7—8 $\mu$, enthaltend 2—4 Sporen von 3 $\mu$ Diameter.

Dieser Organismus ist nach dem genannten Verfasser das wirksamste Ferment bei der Brotgärung[1]).

## Saccharomyces conglomeratus Reess.

Wird von REESS folgendermassen beschrieben: „Sprossungszellen rund, von 5—6 μ Durchmesser, zu Knäueln verbunden, welche dadurch entstehen, dass aus der Achse zweier älterer

---

1) Entscheidende Versuche über die wesentlich wirksamen Faktoren in der Brotgärung wurden noch nicht gemacht. Für die Weissbäckerei wird „Presshefe" benutzt; die Hauptmasse davon besteht aus Alkoholhefenpilzen, und nach allgemeiner Auffassung ist die Hefe hier das einzig wirksame Ferment. Zur Darstellung des Schwarzbrotes wird dagegen der sogenannte „Sauerteig", eine zur Selbstgärung hingestellte, von Mehl, Kleie und Wasser zusammengeknetete Masse benutzt. Diese enthält sowohl Bakterien in grosser Menge wie hefenartige Zellen, darunter Alkoholhefenpilze. Über die Bedeutung dieser verschiedenen Organismen für die Gärung des Schwarzbrotes liegen sehr widerstreitende Ansichten vor.

Nach CHICANDART (1883) und MARCANO soll ein Bakterium das wirksame Ferment sein. BOUTROUX führte die Gärung zur Wirkung von sowohl Bakterien wie Sprosspilzen zurück. LAURENT stellte später den sogenannten Bacillus panificans als den wesentlichen Urheber der Brotgärung auf. DÜNNENBERGERS Untersuchungen führten zu dem Resultate, dass die Sprosspilze als einzig wesentliche Gärungsorganismen im Brote zu betrachten sind; das Aufgehen des Teiges wird dann in erster Linie durch die bei der alkoholischen Gärung hervorgebrachte Kohlensäure bewirkt; ferner durch die Expansion resp. Vergasung von Luft, Alkohol, Wasser und die von Bakterien gebildeten flüchtigen Fettsäuren PETERS fand im Sauerteige vier verschiedene Sprosspilze, von welchen der erste mit Saccharomyces minor Engel zu identifizieren ist. Der zweite hat ungefähr dieselbe Grösse wie Saccharomyces minor; die Zellen sind eiförmig und wachsen in flüssigen Nährlösungen zu ziemlich grossen, zusammenhängenden, reich verzweigten Kolonieen aus; er bildet reichlich Sporen. Ferner wurde eine Mycoderma-Art und eine Art, welche zu Saccharomyces cerevisiae hingeführt wird, gefunden. PETERS beschreibt mehrere Bakterienarten des Sauerteiges (siehe S. 46, 47, 51), darunter doch keine, die alle Eigenschaften des LAURENTschen Bacillus panificans besitzt; im Gegenteil wurden verschiedene Bakterien gefunden, auf die sich diese Eigenschaften verteilten. LAURENT hat daher wahrscheinlich mit unreinen Kulturen gearbeitet. Diese Bakterien gaben keine alkoholische Gärung, auch keine nennenswerte Gasentwickelung im sterilisierten Mehle.

Die obengenannten Untersuchungen geben gute Vorarbeiten für die entscheidenden Experimente über die Ursache und Wirkung beim Aufgehen des Brotteiges.

Zellen, bevor diese in der Richtung ihrer gemeinsamen Längsachse zu einer Zellreihe weiter sprossen, meist gleichzeitig mehrere Sprossungen als Verzweigungen entstehen. Die Asci sehr häufig zu zweien verbunden bleibend oder mit je einer Vegetationszelle. Sporen 2—4, bei der Keimung die Knäuel wieder herstellend. Auf faulenden Trauben und in der Weinhefe zu Anfang der Gärung. Fermentwirkung zweifelhaft."

In HANSENs Kulturen von Hautbildungen der Saccharomyceten traten Zellkolonieen von dem oben beschriebenen Aussehen bei den sechs von ihm zuerst untersuchten Arten in den alten Häuten auf. Da dieser Forscher niemals eine bestimmte Species, welche als REESSsche Saccharomyces conglomeratus bezeichnet werden könnte, in seinen Kulturen traf, so ist er geneigt anzunehmen, dass die erwähnten Zellenkolonieen bei den verschiedenen Saccharomyceten mit dieser Art identisch sein dürfen.

---

Die verschiedenen Hefenrassen oder Hefenarten können nach der Gärungsform in zwei Gruppen geschieden werden: Unterhefe und Oberhefe. Trotz vieler hierüber aufgestellten Behauptungen war es bis jetzt unmöglich, eine wirkliche Umbildung von Oberhefe in Unterhefe oder umgekehrt zu bewerkstelligen. Nach Untersuchungen von HANSEN und KÜHLE ist es wohl möglich, mit einer untergärigen Hefe vorübergehend Obergärungsphänomene hervorzurufen; diese verschwinden aber schnell bei fortschreitender Entwickelung der Hefe. Wenn dann behauptet wurde, dass man durch fortgesetzte Kultur z. B. der Unterhefe bei hoher Temperatur diese in Oberhefe verwandeln könnte, müssen wir vorläufig annehmen, dass die verwendete Unterhefe unrein war und Oberhefe beigemischt enthalten hat, welche während der Kultur bei hohen Temperaturen sich nach und nach auf Kosten der Unterhefe entwickelte, so dass sie endlich die Hauptmasse der Hefe ausmachte.

Als Beispiel zwei verschiedener untergäriger Hefenrassen sollen die in der Brauerei Alt-Carlsberg, Kopenhagen, benutzten „Carlsberg Unterhefe Nr. 1" (Fig. 38) und „Nr. 2" (Fig. 39) genauer beschrieben werden. Schon in der gewöhnlichen

mikroskopischen Untersuchung gewahrt man deutliche Unterschiede:

Die Rasse Nr. 1 zeigt meist längliche Zellen unter denen man nicht selten kleinere, zugespitzte Individuen mit körnigem Inhalte unterscheidet. Wenn die Hefe vom Bottiche ausgenommen, mit Wasser ausgewaschen und kurze Zeit unter Eis gebracht wurde, so bemerkt man, dass die sämtlichen Zellen sehr schnell einen körnigen Inhalt erhalten, und wenn man sie mehrere Tage

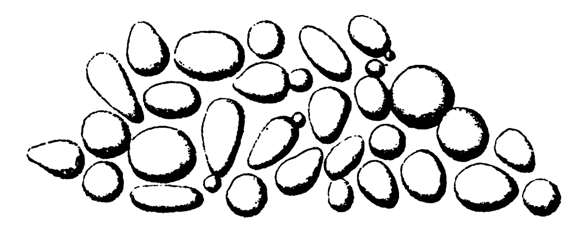


Fig. 38.
Carlsberg Unterhefe Nr. 1 nach HANSENS Zeichnung.

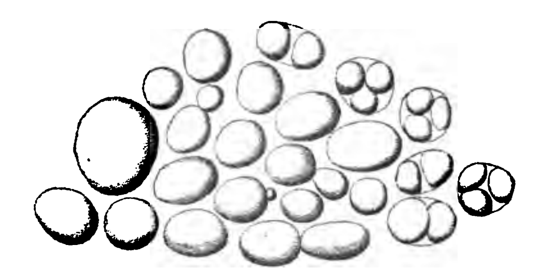


Fig. 39
Carlsberg Unterhefe Nr. 2; einige Zellen mit Sporen, nach HANSENS Zeichnung.

in der angegebenen Weise aufbewahrt, so nimmt die Zahl der toten Zellen sehr schnell zu. Die Zellen der Rasse Nr. 2 sind unter normalen Verhältnissen im Bottiche kurz oval, einige beinahe kugelig, man beobachtet unter ihnen nur sehr wenige verkümmerte Individuen und in der ausgewässerten Hefenmasse behalten die Zellen sehr lange ihren klaren, nur schwach körnigen Inhalt, so wie man auch beim längeren Aufbewahren in dieser Weise nur sehr wenige tote Zellen beobachtet.

In der Gipskultur entwickelt die Rasse Nr. 2 ihre Sporen viel schneller und reichlicher als die Rasse Nr. 1.

Auch die Gärungsphänomene im Bottiche sind verschieden: Nr. 2 giebt feste, hohe Kräusen und eine dicht zusammenhängende Decke; Nr. 1 giebt niedrige Kräusen, oft mit kahlen Stellen. Nr. 2 giebt eine verhältnismässig schnelle Klärung, Nr. 1 eine langsame Klärung. Nr. 2 liegt fest im Bottiche, Nr. 1 giebt dagegen gewöhnlich eine lose zusammenhängende Bodensatzhefe. In der Haupt- und Nachgärung giebt Nr. 2 eine schwächere Attenuation als Nr. 1.

Das fertige Bier der zwei Hefenrassen zeigt in derselben Brauerei grosse Unterschiede: Hinsichtlich des Geschmackes geben die meisten Kenner dem mit Nr. 2 vergorenen Bier den Vorzug; hierüber kann gestritten werden, allenfalls ist der Geschmack ein anderer als bei dem mit Nr. 1 hergestellten. Endlich stellen sich die zwei Rassen sehr verschieden in Betreff der Haltbarkeit des Bieres gegen Hefetrübung: Das mit Nr. 1 vergorene Bier ist entschieden mehr haltbar in der genannten Richtung als das von Nr. 2 stammende. Daher eignet sich die Nr. 1 speziell für Lager- und Exportbiere, die Nr. 2 für Schenk- oder Fassbiere. Diese Rassen-Eigentümlichkeiten haben sich immer im Laufe der Jahre unverändert erhalten.

Eine vorläufige Gruppierung in praktischer Richtung der verschiedenen Rassen untergäriger und obergäriger Bierhefe, welche von HANSEN und in meinem Laboratorium im reinen Zustande dargestellt wurden, stellt sich wie folgt:

### A. Untergärige Rassen.

1. Sehr schnell klärende und schwach attenuierende im Bottiche; stark schaumhaltendes Bier. Dieses ist bei längerer Aufbewahrung nicht haltbar gegen Hefetrübung. Solche Rassen eignen sich nur für Fassbiere (Schenkbiere).
2. Ziemlich schnell klärende und nicht stark attenuierende; Bier stark schaumhaltend; hohe Kräusen; diese Hefen liegen sehr fest im Bottiche. Das Bier ist nicht besonders haltbar gegen Hefetrübung. Eignen sich für Fass- und zum Teil für Lagerbiere.

3. Langsam klärende und stärker attenuierende Rassen; das Bier hat einen feinen Geschmack und Geruch, die Hefe liegt weniger fest im Bottiche. Das Bier ist gegen Hefetrübung sehr haltbar. Für Lagerbiere und speziell für Exportbiere, wenn solche nicht pasteurisiert oder mit Antisepticis behandelt werden, geeignet.

B. Obergärige Rassen.

1. Schwach attenuierende, schnell klärende. Das Bier hat einen süssen Geschmack.
2. Stark attenuierende, schnell klärende. Geschmack kräftiger.
3. Langsam klärende, führen eine normale Nachgärung durch. Geschmack mehr weinartig. Das Bier haltbar gegen Hefetrübung.

Als ein sehr wesentliches Resultat der Erfahrungen in den letzten sechs Jahren soll die Thatsache hervorgehoben werden, die in hohem Grade zur Verwertung der Tragweite der Artscharaktere innerhalb der in Kultur gebrachten Saccharomyceten beiträgt, dass die hier aufgestellte Gruppierung im grossen Ganzen gilt, selbst unter den in weit von einander entfernten Ländern verschiedenartigen praktischen Verhältnissen. So giebt z. B. die Carlsberger Rasse Nr. 1 überall Bier von ganz besonderer Haltbarkeit gegen Hefetrübung, und auch die übrigen oben aufgeführten Rassen haben die angegebenen Eigenschaften in den verschiedenen Brauereien beibehalten.

Ausser der Bier-Oberhefe werden auch besondere obergärige Rassen im Brennereibetriebe und in der Hefenfabrikation verwendet. Im Laboratorium des Verfassers wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Brennereihefen in absolut reinem Zustande entwickelt. Sie zeigten sowohl in den Formen der Bodensatzhefe wie in der Askosporenbildung grosse Unterschiede. Die Arten, welche in der Praxis geprüft wurden, haben auch in dieser Beziehung verschiedene Eigenschaften gezeigt.

Von BÊLOHOUBEK, SCHUMACHER und WIESNER liegen mikroskopische und chemische Untersuchungen von Hefen letztgenannter Art vor, und namentlich enthalten des erstgenannten Verfassers „Studien über Presshefe“ (Prag 1876) genaue Beschreibungen des Aussehens der gemeinen Presshefe unter dem

Mikroskope in den verschiedenen Stadien ihrer Entwickelung und Angaben mikroskopischer Kennzeichen der mehr oder weniger guten Beschaffenheit der fabrizierten Hefe, wie sie nach dem Inhalte der Zellen zu beurteilen ist. Die in Zersetzung begriffenen Zellen der Hefe verändern die Farbe und Konsistenz des Plasmas: dasselbe wird allmählich dunkler, dünnflüssig, die Vakuolen werden grösser, die scharfen Grenzen zwischen Vakuolen und Plasma verschwinden nach und nach, das Plasma zieht sich von der Zellwand zurück und ballt sich schliesslich in der Zellflüssigkeit in unregelmässige Klumpen zusammen; endlich verschwinden auch diese und zuletzt wird die Wand aufgelöst. Ausserdem kommen nach Angabe der genannten Autoren in der Presshefe Zellen vor, in welchen plötzlich eine grössere Anzahl kleiner Vakuolen auftreten; diese „abnorm vakuolisierten Zellen" gehen schnell zu Grunde.

## Andere Sprosspilze.

(Torula, Saccharomyces apiculatus, Mycoderma cerevisiae und vini.)

Als Anhang geben wir eine Übersicht über solche für die Gärungsindustrie mehr oder weniger wichtige Pilze, welche mit den Saccharomyceten darin übereinstimmen, dass sie sich durch Sprossung vermehren; nur ausnahmsweise kommt ein Mycelium unter diesen Arten hervor. Dagegen unterscheiden sie sich alle von den Saccharomyceten durch den Mangel der für diese letzteren charakteristischen inneren Sporenbildung.

Eigentlich müssten die von HANSEN untersuchten Formen, welche ein Mycelium geben, zu den Schimmelpilzen gerechnet werden. Da die Schimmelform jedoch noch nicht systematisch bestimmt ist, werden diese Arten aus praktischen Gründen mit in diese Darstellung gezogen.

### Torula.

Die hefenartigen Formen, welche PASTEUR unter dem Namen Torula abbildet und beschreibt, sind sehr verbreitet und kommen daher nicht selten in den gärungsphysiologischen Analysen vor. Sie treten sowohl mit kugeligen als mit mehr oder weniger ge-

streckten Formen auf und unterscheiden sich, wie es zuerst HANSEN präzisierte, vom Genus Saccharomyces dadurch, dass sie in ihrem Innern keine Sporen bilden können. Sie vermehren sich in den meisten Fällen nur durch Sprossung, in einigen wenigen Fällen zugleich durch Mycelbildung.

HANSEN beobachtete viele verschiedene Arten und hat die folgenden genauer beschrieben.

Die erste tritt in Würze entweder vereinzelt oder in aus wenigen Zellen bestehenden Kolonieen auf. Einige Zellen haben in der Mitte eine grosse Vakuole, bisweilen mit einem kleinen, stark lichtbrechenden Korne. Die Grösse der Zellen ist sehr variierend ($1\frac{1}{2}-4\frac{1}{2}$ $\mu$). Die Art scheidet kein Invertin aus und bringt in Bierwürze eine kaum bemerkbare Alkoholgärung hervor.

Die zweite Art hat unter sonst gleichen Verhältnissen grössere Zellen als die erste (3 bis 8 $\mu$); sie gleicht der vorigen, nur erhalten die Zellen, in Würze kultiviert, oft einen stark körnigen Inhalt.

Die dritte Art, welche unterm Mikroskope wie die letztgenannte aussieht, bringt unter gleichen Verhältnissen bis zu $^7/_8$ Vol.-pCt. Alkohol hervor; sie giebt eine deutliche Schaumbildung und Kohlensäure-Entwickelung, kann aber die Saccharose nicht umbilden.

Die vierte Art (2—6 $\mu$) kann die Saccharose umbilden, und bringt in Würze unter starker Schaumbildung ein wenig über 1 Vol.-pCt. Alkohol hervor, die Maltose vergärt sie aber nicht.

Die fünfte Art, welche (was Form und Grösse der Zellen anbelangt) mit der ersten Ähnlichkeit hat, entwickelt bei Zimmertemperatur auf Würze und auf Hefewasser eine gleichartige, matt gräuliche Haut; ebenso auf Lagerbier, sogar auf Flüssigkeiten, welche bis zu 10 pCt. Alkohol enthalten. Sie bildet die Saccharose um und giebt in solcher Flüssigkeit ein schwaches Häutchen. Dagegen giebt sie keine merkliche Alkoholgärung.

Eine sechste Art, welche aus kugeligen und ovalen Zellen besteht, giebt in Bierwürze eine deutliche Gärung und bis zu 1,3 Vol.-pCt. Alkohol. In Maltoselösungen giebt sie keine Gärung. Sie invertiert Saccharose und giebt in 10 und 15 prozentigen

Lösungen dieser Zuckerart in Hefewasser nach 14 tägiger Kultur bei 25° C. resp. 5,1 und 6,2 Vol.-pCt. Alkohol; die letztgenannte Kultur gab nach 2 Monaten 7 Vol.-pCt. Alkohol. Dextroselösungen derselben Konzentration gaben unter gleichen Umständen resp. 6,6 und 8,5 Vol.-pCt. Alkohol.

Die siebente Art wurde in Erde unter Weinreben gefunden. Die Zellen der Bodensatzhefe sind am häufigsten oval und zum Teil grösser als die der vorigen Art. Die Zellen der Hautbildungen haben teilweise sehr unregelmässige Formen. Diese Torula giebt in Würze nur 1 Vol.-pCt. Alkohol, ruft in Maltose keine Gärung hervor, auch nicht in Saccharose, welche Zuckerart sie nicht invertieren kann. In 10 und 15 pCt. Dextrose in Hefewasser entwickelt sie nach 15 Tagen bei 25° C. resp. 4,6 und 4,5 Vol.-pCt. Alkohol. Nach 28 Tagen enthielten die zwei Kulturen resp. 4,8 und 4,7 Vol.-pCt. Zwei andere Kolben gaben nach langem Hinstande resp. 4,8 und 5,3 Vol.-pCt. Alkohol. HANSEN nimmt an, dass die Art in der Weingärung beteiligt ist und stellt es als wahrscheinlich auf, dass Arten wie die sechste und siebente, welche in Dextroselösung eine kräftige Alkoholgärung hervorrufen, in der Weingärung und andere Fruchtgärungen eine Rolle spielen. Dagegen haben sie wahrscheinlich wenig Bedeutung für die Brauereien und Brennereien, da sie die Maltose nicht vergären können.

Solche Torula-Arten, die kein Invertin besitzen, in Bierwürzekulturen nur ca. 1 Vol.-pCt. Alkohol bilden und in Uebereinstimmung hiermit die Maltose gar nicht vergären können, sind in der Natur sehr verbreitet. So weit die Untersuchungen reichen, rufen diese Arten in Dextroselösungen Gärung hervor.

Den obenstehenden Formen schliessen sich die im Staube der Luft allgemein verbreiteten rotgefärbten Sprosspilze (die Rosahefe in der medizinischen Bakteriologie) am nächsten an; man kennt davon mehrere Arten, aber keine, welche Bedeutung für die Gärungsindustrie hat.

Diese verschiedenen Arten können durch das Mikroskop allein nicht unterschieden werden, auch nicht von den runden Zellen der Saccharomyces-Arten. PASTEUR trennte solche Torulaformen von den übrigen Hefen, weil die von ihm untersuchten Arten nur eine sehr schwache Alkoholgärung hervorbrachten. Nach

obigen Untersuchungen giebt es indess auch darunter Arten mit ausgeprägter Fermentwirksamkeit.

HANSEN nimmt mit einiger Wahrscheinlichkeit an, dass sie von höheren Pilzen abstammen und hat, wie gesagt, in ein paar Fällen bei seinen Kulturversuchen die Entwickelung eines Myceliums beobachtet.

DUCLAUX fand in Milch einen Hefepilz, welcher in einer Lactoselösung Alkoholgärung hervorbringt. Eine Umbildung von Lactose in Galactose wurde nicht beobachtet. Der Pilz scheint am nächsten mit den Torulaformen verwandt zu sein. Die Zellen sind 1,5—2,5 $\mu$ gross und beinahe kugelförmig. Nach den Versuchen DUCLAUXs ist diese Hefe mehr aërobiotisch als die gewöhnlichen Alkoholhefen. Selbst bei starker Lüftung der Flüssigkeit wird aller Milchzucker zur alkoholischen Gärung benutzt. In einer 5 prozentigen Milchzuckerlösung wurde nach 11 tägiger Gärung bei 25° C. 2,5 pCt. Alkohol hervorgebracht. Die günstigste Gärungstemperatur in neutraler Flüssigkeit liegt zwischen 25 und 32° C.; bei 37 bis 40° C. hält die Gärung inne. Geringe Mengen von Säuren wirken hemmend auf die Gärthätigkeit dieser Hefe ein. Sie vergärt auch Saccharose, Lävulose und Maltose.

ADAMETZ beschreibt ebenfalls einen Sprosspilz, welcher Milchzucker vergärt. Da dieser Pilz in Kulturen nach HANSENs Methoden keine endogene Sporen hervorbringt, stellen wir ihn gleichfalls in dieser Gruppe der Nicht-Saccharomyceten auf. Die Zellen, welche ungefähr dieselbe Grösse wie die von Saccharomyces cerevisiae haben, sind kugelrund bis ellipsoidisch. Auf Peptongelatine sind die Kolonieen rund mit schwach buchtiger Umrandung und von dunkelbrauner Farbe. Auf Würzegelatine zeigt die Stichkultur ein oberflächliches, mattes, flaches Häufchen und ein starkes Wachstum im Stichkanale, wovon zahlreiche Strahlen in die Gelatine eindringen. In sterilisierter Milch zeigt der Pilz bei 50° C. schon innerhalb 24 Stunden Gärungserscheinungen, bei 38° C. nach 48 Stunden, bei 25° C. nach ca. 4 Tagen. In dieser Gärung wird nur der Milchzucker zersetzt.

### **Saccharomyces apiculatus** (Fig. 40).

Wie schon bemerkt, ist der Name dieses Pilzes nach der jetzt geltenden Auffassung nicht korrekt, indem zu den Saccha-

romyceten nur solche sprossende Pilze gerechnet werden können, die endogene Sporen hervorbringen; diese Fähigkeit besitzt unser Pilz nicht. Es mag jedoch richtig sein, wie HANSEN vorschlug, vorläufig den alten Genusnamen zu bewahren, bis eine weiter gehende Bearbeitung des ganzen Stoffes vorliegt.

Wie bekannt, gab dieser Pilz die Veranlassung zu einer der schönsten durchgeführten biologischen Untersuchungen, indem HANSEN durch die Forschung mehrerer Jahre erreichte, sowohl ihre Aufenthaltsorte in der Natur wie ihre geregelten Wanderungen zu den verschiedenen Zeiten des Jahres nachzuweisen. Die Ursache, dass diese Spezies zur Untersuchung gewählt wurde, war die, dass, während die übrigen Arten mit äusserst verschiedenen und unbestimmten Formen auftreten, was das Studium ihres Auftretens an verschiedenen Lokalitäten in hohem Grade unsicher macht, dieser Pilz durch seine Form mit Sicherheit erkennbar ist, indem er in Kulturen immer mit citronenförmigen Zellen auftritt: dies ist nämlich die typische Form der Art.

Der Pilz tritt in reichlicher Menge in der Weinhefe auf, namentlich in den ersten Stadien der Gärung, ferner in dem belgischen selbstgärenden Biere und reichlich auf reifen, süssen, saftigen Früchten.

Bringt man ein wenig einer solchen Vegetation in einen Tropfen Nährflüssigkeit unter das Mikroskop, so kann man die Entwickelung des Pilzes verfolgen. Diese ist, wie zuerst von HANSEN nachgewiesen, recht eigentümlich (cf. Fig. 40). Es zeigt sich, dass die von der typischen, citronenförmigen Zelle gebildeten Knospen entweder citronenförmig (*a*, *b*, *c*, *e*, *f*) oder oval (*a*—*c*) sein können; man nimmt ferner wahr, dass die ovalen Zellen zuerst eine oder mehrere Knospen bilden müssen, ehe sie die Citronenform annehmen können (*e*—*f*), und endlich, dass die durch Sprossung erreichte Citronenform einer Zelle ($k$, $k'$, $k''$), während der neuen Sprossung wieder verloren gehen kann ($k'''$). Unter anderen Verhältnissen können die Zellen ganz abweichende Formen annehmen: wurstförmig, halbmondförmig, bakterienähnlich u. s. w. (*g* – *m*). Giebt es nun eine Regel in diesem anscheinenden Gewirre von Formen? In dem Vorhergehenden wurde gezeigt, dass der Pilz zwei Arten von Knospen abschnüren kann, und dass die ovalen Knospen eine oder mehrere Knospen abschnüren

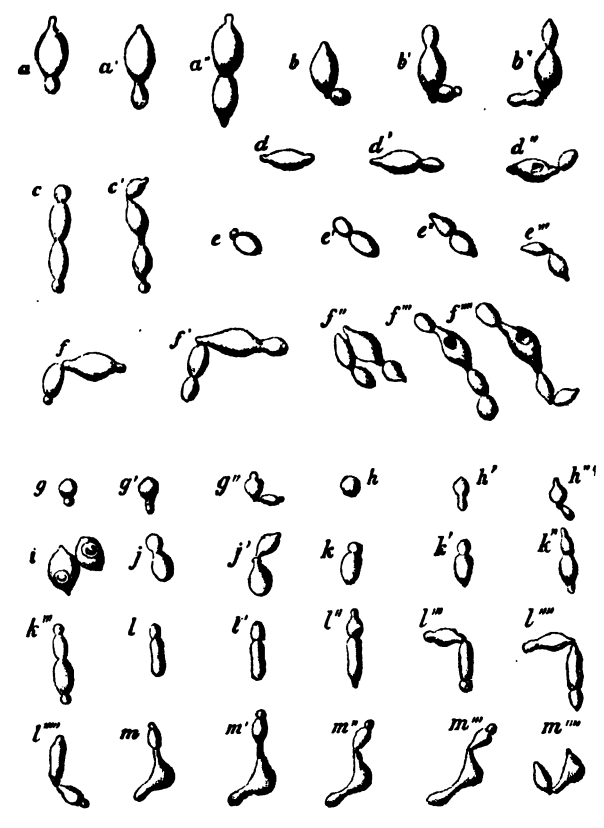



Fig. 40.

Saccharomyces apiculatus nach HANSEN.

Sprossende Zellen. $a$—$a''$ eine Zelle, die von seinem nach unten gekehrten Ende einen Spross im Verlaufe von $3^{1}/_{4}$ Stunde entwickelt; $b$—$b''$ eine ähnliche Entwickelungsreihe, wo der Spross sich vom oberen Ende der Mutterzelle bildet, während schon früher vom entgegengesetzen Ende ein Spross abgeschnürt war; $c$ ist eine Zellenreihe, $c'$ dieselbe $^{3}/_{4}$ Stunden später: der unterste Spross hatte wie die oberhalb dieser gelegenen Zellen die typische Form der Art erreicht, sie wird aber in der Abbildung vom Ende gesehen, so dass ihre Längsachse senkrecht auf der Ebene des Papieres steht. $d$—$d''$ Entwickelung in $1^{1}/_{4}$ Stunden; $e$—$e'''$ in $2^{1}/_{4}$ Stunden; $f$—$f''''$ in 3 Stunden. In $e$—$f$ sieht man, dass die ovalen Zellen zuerst einen Spross bilden und erst danach die typische Citronenform annehmen. $g$—$m$ abnormale Zellen und Entwickelungsreihen.

müssen, bevor sie die typische Form annehmen. Die Frage ist nun: Unter welchen Bedingungen werden die zwei Arten von Knospen entwickelt? Durch Kulturversuche wurde gezeigt, dass die citronenförmigen Knospen namentlich in den ersten Stadien der Kultur sich entwickeln, später dagegen von den ovalen zurückgedrängt werden.

Wir geben hiernach die weitere Geschichte des Pilzes in physiologischer und biologischer Richtung.

Saccharomyces apiculatus ist eine Untergärungsform, welche in der Bierwürze Alkoholgärung hervorbringen kann; doch ist die Gärung in dieser Flüssigkeit schwach, indem er nur 1 Vol.-pCt. Alkohol hervorbringt, während Saccharomyces cerevisiae (Unterhefe) unter den gleichen Verhältnissen 6 Vol.-pCt. giebt. Dies rührt davon her, dass der Pilz die Maltose nicht vergären kann. HANSEN entdeckte ferner die Eigenschaft, dass Saccharomyces apiculatus kein Invertin ausscheidet. In Lösungen von 15 und 10 pCt. Dextrose in Hefewasser ruft er dagegen eine kräftige Gärung hervor und bildete in einem Versuche bis zu 3 Vol.-pCt. Alkohol. Nach 3 Monaten gab die Flüssigkeit noch Reaktion auf Zucker, während die Alkoholmenge in den letzten $1^1/_2$ Monaten nicht gestiegen war. Der Pilz konnte also die Gärung nicht zu Ende bringen. In einem anderen Versuche HANSENs wurden bis zu 4,3 Vol.-pCt. Alkohol hervorgebracht.

Durch Versuche, bei welchen dieser Pilz mit Saccharomyces cerevisiae vermischt in Bierwürze kultiviert wurde, zeigte sich, dass er wohl als der Schwächere von Saccharomyces cerevisiae zurückgedrängt wird, dass er jedoch in nicht geringem Grade die Kulturhefe hemmt.

In Kolben mit derselben Bierwürze und bei derselben Temperatur, deren jeder eine Art enthält, wird Saccharomyces apiculatus im gegebenen Zeitintervalle sich stärker als Saccharomyces cerevisiae vermehrt haben.

Insofern nun der Pilz in der kritischen Zeit des Jahres in grösserer Menge in der Würze auftritt, kann er sich längere Zeit neben der Saccharomyces cerevisiae erhalten und dieselbe wohl ein wenig hemmen; wenn das Bier aber in den Lagerraum überführt wird, so liegt der Pilz unwirksam in der alkoholreichen Flüssigkeit und geht häufig zu Grunde.

Die interessantesten Abschnitte im Leben dieses Pilzes sind seine ebenfalls von HANSEN aufgeklärten Verhältnisse in der freien Natur. Durch mikroskopische Untersuchungen und Kulturversuche zeigte sich im Laufe des Sommers, dass der Pilz mit der Reife der süssen saftigen Früchte (Kirschen, Stachel- und Erdbeeren, Trauben, Pflaumen u. s. w.) auf diesen in reicher Entwickelung auftritt. Dagegen wurde er nur als reine Ausnahme auf denselben Früchten im unreifen Zustande gefunden. Da er auf den genannten reifen Früchten in kräftiger Sprossung gefunden wird, dagegen gar nicht oder nur ausnahmsweise auf anderen Früchten, Blättern, Zweigen u. s. w., so war hiermit dargethan, dass Saccharomyces apiculatus auf derartigen reifen Früchten seinen eigentlichen Aufenthaltsort hat. Dies wurde ferner dadurch bewiesen, dass er immer, ohne Ausnahme, in der Erde unter den Kirsch- und Pflaumenbäumen, Weinreben und anderen Pflanzen, an dessen Früchten er auftrat, gefunden wurde, dagegen nur äusserst selten in den zahlreichen Erdeproben der verschiedensten anderen Lokalitäten. Ohne Zweifel bringen die herabgefallenen Früchte und der Regen den Pilz auf und in die Erde an den genannten Orten, und die Frage ist dann, ob er auch hier überwintert. Die Antwort wurde auf zweierlei Weise erhalten: Teils wurden im Laufe des Winters und des Frühjahrs zahlreiche Proben der Erde von diesen Orten genommen — diese gaben, in Kolben mit Würze eingeführt, in weitaus den häufigsten Fällen eine kräftige Vegetation unseres Pilzes — teils wurden Kulturen von Saccharomyces apiculatus in der Erde mit aller Vorsicht angebracht und im Laufe des Winters sich selbst überlassen. Im Frühjahre und Vorsommer wurde diese Erde wieder aufgenommen, und die Kulturversuche legten dar, dass der Pilz in allen Proben lebendig war. Hierdurch war bewiesen, dass der Pilz in der Erde überwintern kann, wie es früher gezeigt wurde, dass er wesentlich nur an den angegebenen Orten in der Erde sich findet.

Schliesslich blieb noch zu beweisen, dass die Erde sein eigentlicher Aufenthaltsort in der Winterzeit ist; dies geschah in der Weise, dass HANSEN von Januar bis Juni den Staub an den verschiedensten Orten untersuchte, ferner die eingetrockneten, herabgefallenen Früchte vieler Pflanzen und end-

lich auch verschiedene Exkremente. Diese 71 Analysen gaben ein negatives Resultat, und hierdurch war der Beweis geliefert: Der eigentliche Winter-Aufenthaltsort des Pilzes ist die Erde unter den genannten Pflanzen. Er bewahrt in der langen Winterzeit sein gewöhnliches Aussehen und wird im Sommer durch die vereinten Kräfte der Insekten und des Windes wieder in die Luft emporgeführt.

Es ist klar, dass der Pilz zu der Zeit, wo er in reicher Menge auf den genannten reifen Früchten auftritt, von den Luftströmungen auch nach anderen Orten geführt werden kann, so auch auf unreife Früchte. Schon in seiner ersten Abhandlung gab HANSEN an, dass das seltene Vorkommen auf unreifen Früchten darin seinen Grund haben möchte, dass der Pilz hier schnell zu Grunde geht, teils wegen Mangel an Nahrung, teils wegen der Austrocknung seiner Zellen. Später hat er durch Experimente die Richtigkeit dieser Anschauung dargethan. Er rührte teils alte, teils junge Zellen in Wasser um und brachte sie in dünnen Schichten entweder auf Objektgläser oder auf dünn ausgezogene baumwollene Büschel, wonach sie der Eintrocknung, vor der Sonne geschützt, überlassen wurden. Nach weniger als 24 Stunden waren sämtliche Zellen abgestorben. Es leuchtet von selbst ein, dass die vereinzelt liegenden Zellen auf den unreifen Früchten noch ungünstiger als im Experimente gestellt sind. — Wurden dagegen die Zellen in dickeren Schichten in Baumwolle oder Filtrierpapier eingewickelt, so hielten sie sich wie in der Erde lange Zeit lebendig, z. B. in Filtrierpapier über acht Monate.

**Mycoderma cerevisiae und vini (Saccharomyces Mycoderma)** gehören noch jetzt, trotz der umfangreichen Litteratur, welche über diese Pilze vorliegt, zu den wenigst bekannten unter den Organismen gärender Flüssigkeiten, indem die Speciesfrage hier noch nicht eingehend erörtert wurde. Sie treten in den Kulturen sehr eicht auf und haben — nach BÊLOHOUBEKs und KUKLAs Beobachtungen in böhmischen Brauereien — durch ihre starke Entwickelung im Biere sehr bedeutende Geldverluste bewirkt.

Das auf dem Biere und der Würze auftretende Mycoderma (cerevisiae) ruft, wie bekannt, eine matte, grauartige, oft gefaltete Kahmhaut hervor. Die gleiche Vegetation erhielt HANSEN, wenn

er Carlsberger Lagerbier in offenen Gläsern niedrigeren Temperaturen — 2 bis 15° C. — aussetzte. Der Pilz entwickelt sich noch bei 33° C.; bei Temperaturen oberhalb 15° C. weicht er jedoch mehr und mehr den Konkurrenten, namentlich wenn man 26° C. passiert. Da er somit bei niedrigen Temperaturen sehr gute Chancen für seine Entwickelung hat, so hat man Grund, sein Umsichgreifen im Lagerkeller zu fürchten, zumal das Lagerbier für diesen Organismus eine weit günstigere Nährflüssigkeit als die Würze ist. Dies ging aus folgenden Versuchen hervor: Wenn HANSEN Spuren einer reinen Kahmhaut in offene Gläser mit Lagerbier und Würze überführte und diese in freier Luft stehen liess, wo verschiedene Keime zugegen waren, so hielt sich die Kultur im Biere beinahe immer rein, während auf der Würze verschiedene Arten auftraten.

Die rein mikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass Mycoderma in verschiedenen Formen auftreten kann; die Zellen sind gewöhlich klar und weniger lichtbrechend als die der eigentlichen Saccharomyceten; in jeder Zelle treten gewöhnlich 1, 2 oder 3 stark lichtbrechende Körner auf, welche sich oft in einer zitternden, rollenden Bewegung befinden.

WINOGRADSKY wies nach, dass Mycoderma vini, in Reinkulturen nach HANSENs Methode dargestellt, seine Form nach der Zusammensetzung der Nährflüssigkeit ändert; er experimentierte teils mit Flüssigkeiten, deren mineralische Bestandteile konstant blieben, während die organischen Stoffe wechselten, teils mit solchen, wo das Entgegengesetzte der Fall war.

Obgleich DE SEYNES, REESS, ENGEL und CIENKOWSKI meinten, bei diesem Pilze Askosporen gefunden zu haben, so gelang es später doch nicht, diese Bildungen hervorzurufen; die vorliegenden Figuren deuten darauf hin, dass man die bei vielen einzelligen Pilzen im Ruhestadium auftretenden Fettkügelchen mit den Sporen verwechselt hat; in einzelnen Fällen scheint man auch durch Beimischung echter Saccharomyceten getäuscht worden zu sein. Der alte Name Mycoderma des Pilzes ist daher mehr passend als der neue Saccharomyces.

Es wurde somit vorläufig nicht genügend dargethan, ob Mycoderma cerevisiae und vini verschiedene Arten sind.

Ein Fortschritt wurde jedoch gemacht, indem HANSEN ein

rein makroskopisches Kennzeichen für diesen Genus oder diese Gruppe von kahmhautbildenden Hefezellen gefunden hat. Wie früher bemerkt, geben die verschiedenen Saccharomyces-Arten und Saccharomyces apiculatus auf einer Mischung von Würze und Gelatine Kolonieen, welche nicht deutlich von einander gesondert werden können. Anders stellt sich aber die Sache für die Mycoderma-Arten. Während die eigentlichen Saccharomyceten in der Gelatine Flecken von hell graugelber Farbe geben, mit trockener oder glänzender Oberfläche und als kleine Stecknadelköpfe geformt, sind dagegen die durchgebrochenen Flecken des Mycoderma cerevisiae und vini und einiger verwandten Arten hellgrau und hautartig ausgebreitet oder schalenförmig vertieft. Hat man dies ein Mal selbst gesehen, so ist es ziemlich leicht, diese Flecken zu kennen.

Was die genetische Verbindung dieses Pilzes mit dem Soorpilze betrifft, liegt eine recht grosse Litteratur vor, welche zeigt, wie wenige feste Charaktere man zur Untersuchung und Bestimmung der Vegetation besitzt.

Diese Pilze können im Substrate bedeutende Änderungen hervorrufen. Man findet in der Litteratur Angaben darüber, dass sie, in eine zuckerhaltige Nährflüssigkeit getaucht, eine schwache Alkoholgärung geben können, und dass sie an der Oberfläche vinöser Flüssigkeiten eine Oxydationsgärung hervorrufen, wodurch in einigen Fällen Alkohol zu Kohlensäure und Wasser, in anderen zu Essigsäure umgebildet wird; sie sollen auch Fettsäuren bilden, dieselben oxydieren und Ätherarten hervorbringen können (SCHULZ). Nach HANSEN ruft der Mycoderma cerevisiae des untergärigen Bieres keine Alkoholgärung hervor und vermag auch nicht eine Rohrzuckerlösung zu invertieren.

# 6. Kapitel.

## Die Anwendung der Resultate der wissenschaftlichen Forschung in der Praxis.

Die Frage: Welche für die Praxis direkt verwendbaren Resultate können aus den in diesem Buche dargestellten Thatsachen entnommen werden? — lässt sich in aller Kürze folgendermassen beantworten.

PASTEUR hat nachgewiesen, dass die Bakterien in die verschiedenen Gärungen störend eingreifen und in der Flüssigkeit Krankheiten hervorrufen können.

Man muss folglich in der Weise arbeiten, dass Infektionen dieser Art vermieden werden, am besten dadurch, dass die unreine Luft keinen Zutritt zu den Flüssigkeiten erhält. Die Konsequenz dieser Lehre ist für die Brauerei speciell die Weglassung der offenen Kühlschiffe und Kühlapparate, die Lüftung der Würze durch vorher geglühte oder mittels Baumwolle gereinigte Luft, und die Reinigung der Luft in den Gärungsräumen.

Von grossem praktischem Werte sind ferner die im Kap. VII seiner Études sur la bière (1876) gegebenen Erläuterungen über die Bedeutung der Oxydation der Würze während der Abkühlung. Durch direkte Messungen der Sauerstoffmenge in der Würze zeigte PASTEUR, dass ein gewisses Quantum Sauerstoff teils im freien, teils im gebundenen Zustande in der Würze den Gang der Gärung und die Klärung beeinflusst, dass aber der Sauerstoff, wenn sein Gehalt in der Würze gewisse Grenzen überschreitet, schädlich auf den Charakter (force et arome) des Bieres einwirken kann (S. 377).

Schon durch einige der allerersten Untersuchungen über die Urzeugung (generatio aequivoca) — SPALLANZANI 1765, 1776 und namentlich SCHWANN 1837 — wurden Aufklärungen darüber gegeben, wie man Flüssigkeiten von allen lebendigen Keimen befreien und also steril machen kann. Diese Entdeckungen bildeten

nicht nur die Grundlage für die moderne Bakteriologie, sondern bekamen auch bald einen grossartigen Einfluss im praktischen Leben. Eine direkte praktische Konsequenz von den grundlegenden Versuchen SPALLANZANIs war APPERTs Verfahren zur Konservierung von Nahrungsmitteln sowohl thierischer wie pflanzlicher Natur (1804). Dieses Verfahren, „das Pasteurisieren" entwickelte PASTEUR weiter, und es erhielt danach grosse Verwendbarkeit zum Konservieren von Bier, Wein und Essig. In dieser letzten Richtung gebührt doch eigentlich dem schwedischen Naturforscher SCHEELE die Ehre, denn er hatte schon im Jahre 1782 dasselbe Verfahren für den Essig angewendet. Die Praxis berücksichtigte jedoch nicht diese schöne Entdeckung, und sie wurde vergessen, bis PASTEUR selbst die Aufmerksamkeit darauf hinlenkte. Wir haben hier wieder ein neues Beispiel davon, dass bedeutungsvolle Resultate nicht auf einem Male erreicht werden, sondern nach und nach durch die Anstrengungen mehrerer Forscher, indem der eine auf den Errungenschaften des anderen weiter baut. In der neuesten Zeit wurde auch — namentlich seit KOCHs Entdeckung des Tuberkulosebacillus — das Sterilisieren der Milch allgemein benutzt.

Die in den Études dargestellten Lüftungsversuche gaben die Veranlassung zu einer grossen Reihe von Arbeiten, durch welche wichtige Aufklärungen über die Gärungs- und Vermehrungsfähigkeit der Hefezelle bei verschiedener Luftzufuhr gewonnen wurden.

Dieses Verhältnis spielt eine grosse Rolle in der Spiritus- und Presshefe-Fabrikation. In der Brauerei hat sich gezeigt, dass man innerhalb gewisser, von der Hefenart bestimmten Grenzen, die Klärungsdauer und Attenuation des Bieres durch passende Lüftung der Würze regulieren kann. Die Frage ist doch leider noch so wenig praktisch durchgearbeitet, dass keine allgemein giltigen Regeln aufgestellt werden können.

Wie S. 44 mitgeteilt wurde, hat PASTEUR auch den Anfang gemacht, die Essigsäurebakterien bei der Essigfabrikation zu verwenden.

Über das Verhalten der Bakterien in der Spiritus- und Presshefe-Fabrikation liegt eine ganze Reihe von Beobachtungen verschiedener Forscher vor, welche jedoch alle

sehr allgemein gehalten sind und daher im einzelnen vorliegenden Fall keine sicheren Schlüsse zulassen. Dies rührt hauptsächlich davon her, dass die festen Unterscheidungsmerkmale dieser Mikroorganismen noch nicht gegeben sind.

Die Ursache dazu, dass das von PASTEUR vorgeschlagene Verfahren zur Reinigung der Hefe keine wirkliche Bedeutung für die Praxis erhalten konnte, wurde früher (S. 89—91) angegeben.

Mit HANSENs Arbeiten über die Alkoholgärungspilze begann, wie AUBRY sagt, eine neue Ära in der Geschichte der Gärungsindustrie. Dass diese Arbeiten, wie alle bedeutungsvollen Entdeckungen, sich in mehreren Punkten den Resultaten der Vorgänger anlehnen, ist selbstverständlich. Im Jahre 1883 wies HANSEN nach, dass die allgemein gefürchtete Hefetrübung, sowie unbeliebte Änderungen im Geschmack und Geruch, also überhaupt einige der häufigst vorkommenden und schlimmsten Krankheiten des Bieres nicht, wie es die damalige allgemeine Auffassung war, von Bakterien, vom Wasser, von dem Malze, von der besonderen Braumethode oder dergleichen herrühren, sondern dass diese Krankheiten auf die Hefe selbst zurückgeführt werden müssen, indem die Anstellhefe in solchen Fällen ausser der Kulturrasse auch andere Saccharomyces enthält, welche Krankheitserreger sind (Sacch. Past. I. und III., Sacch. ellipsoideus II.)

Danach zeigte er, dass sich unter dem Namen Saccharomyces cerevisiae verschiedene Arten oder Rassen verbergen, die in den zwei Gruppen obergärige und untergärige Hefe aufgestellt werden, und welche dem Biere eine sehr verschiedene Beschaffenheit geben können.

Auf diesen wissenschaftlichen Untersuchungen basiert sich als rationelle Konsequenz das dritte Glied seines neuen Systems: seine Reinkultur der Hefe. Befreit man die unreine Hefemasse von wilden Hefen, sowie von Bakterien und Schimmelpilzen, so ist doch damit also nicht alles gethan; wenn eine so gereinigte Hefe mehrere Arten von Saccharomyces cerevisiae enthält, so arbeitet man nach obigem noch immer unsicher wie vor der Reinigung, und dazu kommt noch, dass eine solche Hefemasse immer in ihrer Zusammensetzung während der Gärungen Schwankungen unterliegt. Man erhält also erst dann die wirkliche

Konstanz im Betriebe, wenn von der Hefemasse die geeignete Rasse durch planmässige Auswahl herausgesucht und für sich allein propagiert wird. Hierzu gab HANSEN auch die Methode (S. 20—24).

Die durch viele Jahre geführten planmässigen Studien HANSENs über die Konstanz der Charaktere der Hefenarten unter Brauereiverhältnissen haben ergeben, dass sie nur geringe Änderungen aufweisen, welche für die Praxis ohne Bedeutung sind; Resultate, welche von verschiedenen Forschern bestätigt wurden.

Durch die von HANSEN gefundenen biologischen und physiologischen Merkmale der Arten fand er zugleich eine Methode für die praktische Analyse der Brauereihefe, wodurch ermöglicht wird, sich bei Zeiten gegen das Überhandnehmen fremder Hefen zu sichern. Es wurde schon früher durch seine Experimente im grossen nachgewiesen, dass die biertrübenden Formen in einem Verhältnisse bis zu $^1/_{41}$ der Anstellhefe gegenwärtig sein können, ohne irgend welchen schädlichen Einfluss auszuüben, wenn der Betrieb regelmässig geführt wird. Mittels der analytischen Methode HANSENs kann aber (nach den Versuchen HOLMs und POULSENs) eine Einmischung bis zu $^1/_{200}$ wilder Hefen mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Aus zahlreichen nach dieser Methode ausgeführten Analysen resultiert die Lehre, dass die früher allgemein aufgestellten Kennzeichen für den Verlauf einer guten Gärung nicht ausreichen, um das Vorhandensein der Krankheitserreger nachweisen zu können, indem sowohl Decke der Flüssigkeit als Attenuation, Bruch und Klärung zufriedenstellend sein können, während die Hefe doch stark von Krankheitskeimen angesteckt ist.

Da die verschiedenen Heferassen gegenüber den konkurrierenden Krankheitskeimen ungleich widerstandsfähig sind, so ist es in vielen Fällen von grosser Bedeutung, dass man mit kurzen Zwischenräumen grössere Mengen absolut reiner Hefe in den Betrieb einführen kann, nachdem die passende Heferasse einmal durch planmässige Versuche ausgewählt wurde. Zu diesem Zwecke dient der von HANSEN und KÜHLE konstruierte Hefepropagierungs-Apparat, welcher, mit einer absoluten Reinkultur einmal versehen, jahrelang kontinuierlich arbeiten kann.

Der Apparat (Fig. 41), welcher in HANSENs: „Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie“, München 1889[1]) detailliert und mit Anleitung zum Gebrauche beschrieben wurde, besteht

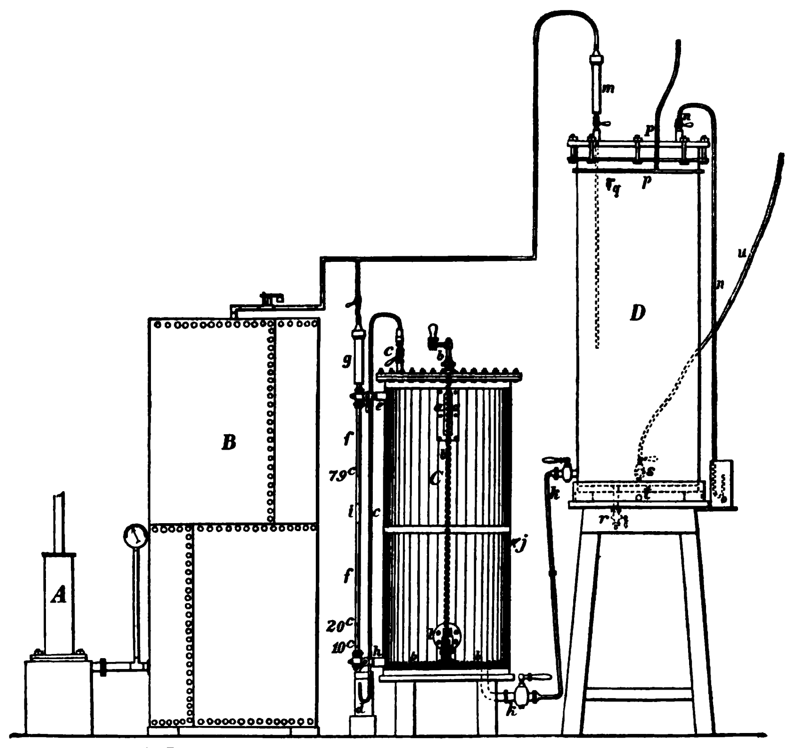



Fig. 41. Hefe-Propagierungsapparat, von HANSEN und KÜHLE konstruiert.

*A* Luftpumpe, *B* Luftbehälter, *C* Gärungscylinder: *a* Fenster, *b b b* Rührapparat, *c c* zweimal gebogenes Rohr, *d* Gefäss mit Wasser, *l* Abzapfhahn, *f f* Glasrohr, welches durch die Röhren *e* und *h* mit dem Cylinder in Verbindung steht und mit Marken zum Abmessen bestimmter Flüssigkeitsmengen versehen ist, *g* Filter, *i* Kautschukschlauch mitten am Glasrohr eingeschaltet, *j* Rohr und Schlauch zum Hineinführen der Reinkultur, *k k* Verbindung mit *D*, dem Würzecylinder: *m* Filter, *n n* zweimal gebogenes Rohr, *o* Gefäss mit Wasser, *p p* Überrieselungsrohr, *u* Würzeleitung mit Hahn *s*, *t* Ablaufsrohr für das Kühlwasser, *q* Hahn (hierzu lässt man die Würze steigen), *r* Abzapfhahn.

1) In diesem Werke hat er überhaupt eine Darstellung seines ganzen Systems gegeben.

aus drei Hauptteilen und die sie verbindenden Leitungsröhren, nämlich: 1. die Abteilung für das Lüften, aus der Luftpumpe (*A*) und Luftbehälter (*B*) bestehend; 2. der Gärungscylinder (*C*) und 3. der Würzecylinder (*D*).

Die durch einen Vorfilter teilweise gereinigte Luft wird in den Luftbehälter hineingepumpt und kann davon zu dem Würzecylinder oder Gärungscylinder geführt werden. In beiden Fällen wird die Luft durch sterilisierte baumwollene Filter (*g*, *m*) geführt. Der Würzecylinder steht durch eine Leitung mit dem Würzekessel direkt in Verbindung und empfängt von diesem die kochend heisse Würze, welche dann im geschlossenen Cylinder gelüftet und durch Überrieselung gekühlt wird. Man drückt danach diese zum Anstellen vorbereitete Würze in den Gärungscylinder hinein. Dieser Cylinder ist wie der Würzecylinder nach demselben Principe wie die gewöhnlichen zweihälsigen Kolben konstruiert. Er besitzt ein zweimal gebogenes Rohr (*c d*), welches in einem Wasserbehälter hineintaucht, ein horizontales Glasrohr (*f i f*), durch welches die Höhe der Flüssigkeit im Cylinder gemessen werden kann, einen Apparat zum Umrühren der abgesetzten Hefe (*b b*) und einen speziell zu dem Zwecke konstruierten Ablasshahn für Bier und Hefe (*l*). Ungefähr an der Mitte des Cylinders befindet sich ein kleines Seitenrohr (*j*) mit Schlange, Quetschhahn und Glasstöpsel versehen. Nachdem ein Teil der Würze in den Gärungscylinder hineingedrückt worden ist, wird die absolut reine Hefe, welche in einem besonders hierzu eingerichteten Kolben zu der Brauerei geschickt wird, durch die Schlange bei *j* eingeführt; diese wird wieder geschlossen und man kann, je nach der zugesetzten Hefemenge, entweder sogleich oder nach Verlauf von einigen Tagen die übrige Würzemenge überführen.

Wenn der Apparat in einem Raume aufgestellt wurde, wo es notwendig ist, die Temperatur während der Gärung zu regulieren, so wird der Gärungscylinder mit einer kupfernen Enveloppe versehen.

Durch diesen einfachen Apparat ist es möglich, mit kurzen Zwischenräumen absolut reine Anstellhefe für ca. 8 *hl* Würze zu entwickeln. Einmal im Gange gesetzt, wirkt der Apparat

wie gesagt kontinuierlich[1]). Übrigens verweise ich auf die genaue Beschreibung in dem oben citierten Werke HANSENs.

Um die planmässig ausgewählte Reinkultur im flüssigen Zustande versenden zu können, wurde von HANSEN ein besonderer Kolben konstruiert. In solchen Kolben kann die Hefe auf sehr langen Abständen versandt werden, und es ist mit keinen Schwierigkeiten verbunden, sie davon sicher in den Cylinder hineinzuführen.

Um kleine Mengen der absoluten Reinkulturen zu versenden, und zwar so, dass sie leicht und sicher vermehrt werden können, gab HANSEN das nachstehende Verfahren an: Kleine Kolben mit Seitenröhre werden teilweise mit Baumwolle verpackt, das Ganze danach sterilisiert, und endlich werden nach der Abkühlung nur Spuren der betreffenden Hefe in die Baumwolle eingeführt.

Am Ankunftsorte entwickelt man diese kleine Portion weiter in sterilisierte Würze in den zweihälsigen Kolben, bis ein passendes Quantum zum Hineinführen in den Cylinder erreicht ist.

Dieses Verfahren hat namentlich beim Versandt der absolut reinen Hefe nach den Tropenländern grossen Nutzen gestiftet. Es wäre sonst fast unmöglich gewesen, Reinkulturen nach Australien, Süd-Amerika und den entferntesten Ländern Asiens zu senden[2]).

Von grösster Bedeutung ist es, dass man selbst nach dem Verlaufe von Jahren immer wieder genau dieselbe einmal ausgewählte Hefe zur Verfügung haben kann, indem man im Laboratorium die absolute Reinkultur in einer 10procentigen Saccharoselösung aufbewahrt. Die Kulturhefen können sich in

---

1) Der Apparat wird vom Kupferschmied W. E. JENSEN, Kopenhagen V. — mit Garantie für genaue Übereinstimmung mit dem originalen Apparat — fabriziert.

2) Das Versenden von Hefeproben in sterilisiertem Filtrierpapier hat einen ganz anderen Zweck. Man benutzt dieses Verfahren entweder um eine unreine Brauereihefe zum betreffenden Laboratorium einzusenden, um von diesem Muster eine absolute Reinkultur zu erhalten, oder eine Probe von einer Reinkultur wird in dieser bequemen Weise im Briefcouvert abgesandt; es ist aber einleuchtend, dass man in dieser Weise nicht mehr eine absolute, zuverlässige Reinkultur vor sich hat; die Probe kann also nur als Material für eine neue Reinkultur benutzt werden.

einer solchen Lösung durch Jahren lebendig und ohne Veränderung ihrer Eigenschaften erhalten.

Die absolut reinen, für die Industrie dargestellten Massenkulturen planmässig ausgewählter Hefenrassen sind jetzt, nach kaum 6 Jahren, nachdem der erste Versuch in der berühmten Brauerei Alt-Carlsberg, Kopenhagen, gemacht wurde, in zahlreichen Brauereien in allen bierbrauenden Ländern, nicht nur in Europa sondern zugleich in Amerika, Asien und Australien eingeführt.

Vom Laboratorium des Verfassers dieses Buches ging eine recht beträchtliche Zahl von Reinkulturen aus, sowohl von untergäriger als von obergäriger Hefe. So hat auch die wissenschaftliche Station München sowie in der neuesten Zeit mehrere andere Laboratorien zahlreiche Reinkulturen untergäriger Hefen vorgenommen. Berichte hierüber liegen besonders von dem Direktor Dr. AUBRY, dem Laboratorienvorstande Dr. WILL, vom Professor Dr. LINTNER und Laboratorienvorstande Dr. REINKE vor. Ich führe einige dieser Urteile hier auf.

Prof. Dr. LINTNER giebt das folgende Resumé der Sachlage in 1885[1]):

Nachdem verschiedene Brauereien die reinkultivierten Hefenrassen Carlsbergs verwendet haben, ferner die wissenschaftliche Station in München auch mit Münchener Hefen reinkultivierte Hefe in den Brauereien eingeführt hat, lassen sich die sich ergebenden Thatsachen in folgendem zusammenfassen:

1. Durch Verunreinigung mit sogenannten wilden Hefen kann eine sonst normale Brauhefe allmählich untauglich zur Erzeugung eines wohlschmeckenden und haltbaren Bieres werden.
2. Eine solche Verunreinigung kann durch die zur Sommer- und Herbstzeit im Luftstaube enthaltenen wilden Hefen eintreten, oder auch durch Einschleppung mittels anderer Hefen oder Gelägerbestandteile.
3. Aus einer verunreinigten Hefe lässt sich die erwünschte Brauhefe in reinem, gutem Zustande unter Anwendung der Prüfungs- und Reinzüchtungs-Methoden HANSENs isolieren.

---

1) Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 1885, S. 399.

4. Die reingezüchtete Hefe zeigt in hervorragendem Grade wieder die Eigenschaften der ursprünglichen Hefe vor der Verunreinigung, sowohl in Bezug auf Vergärungsgrad als auch Geschmack und Haltbarkeit der betreffenden Biere.
5. Es existieren verschiedene Rassen des normalen Untergärungsbierhefepilzes (Sacch. cerevisiae) mit specifischen Eigenschaften, welche letztere als Rasseneigentümlichkeit sich konstant erhalten.

Direktor Dr. AUBRY sagt[1]): „Ausser den angegebenen Brauereien (Spatenbräu und Leistbräu, München) hatte eine grosse Anzahl von Brauereien des In- und Auslandes von der Carlsberger reinen Hefe erhalten und damit versuchsweise ihre Gärungen angestellt. Selbstverständlich waren die Resultate, welche man erwartet hatte, nicht überall eingetroffen, der Vergärungsgrad wurde grösstenteils als zu niedrig bezeichnet[2]), der Geschmack war nicht der ortsbeliebte u. s. w., aber alle Berichte, welche uns bekannt wurden, lauteten günstig über Haltbarkeit, Glanz der Biere und Freiheit von Hefengeschmack derselben. Die guten Eigenschaften der Hefe haben ausserdem manche Brauereien veranlasst, dieselbe ständig einzuführen, wie z. B. die Liesinger Brauerei in Liesing bei Wien. In der gegenwärtigen Braukampagne hat die Brauerei zum Spaten in München in umfangreichster Weise von der aus Carlsberg bezogenen Hefe Anwendung gemacht, und ebenso war auch in der Brauerei zum Franziskanerkeller in München ein grosser Teil der den Winter hindurch verwendeten Stellhefen von Carlsbergs Reinkulturen abstammend. Die Gärungserscheinungen und die Resultate hinsichtlich Geschmack, Mousseux und Haltbarkeit der Biere waren allen Anforderungen entsprechend. Die etwas niedrigen Vergärungen scheinen im Charakter der Hefe zu liegen, da sie sich konstant erhalten. Der Geschmack der Biere ist anfangs dem gewohnten Münchener Geschmack gegenüber etwas verschieden, nähert sich aber bei späteren Generationen letzterem etwas mehr, bleibt aber weich und lieblich.“

1) Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 1885.
2) Carlsberg Unterhefe Nr. 2.

Laboratorienvorstand Dr. WILL schreibt[1]): „Wenn nun, wie ich eben klargelegt zu haben glaube, die Möglichkeit gegeben ist, die für den Brauereibetrieb schädlichen Hefenarten sicher zu erkennen, so müssen wir aus diesen Errungenschaften auch für die Praxis Nutzen ziehen und nur solche Zeuge verwenden, welche die für die schädlichen und den Betrieb so häufig in der empfindlichsten Weise störenden Arten angegebenen Merkmale nicht zeigen. Dies wird aber nur dann möglich sein, wenn aus den gewöhnlichen Brauhefen die mit den Eigenschaften der normalen Unterhefe begabten Hefezellen isoliert und unter Ausschluss jeglicher Verunreinigung weiter gezüchtet werden, mit anderen Worten, wenn nur rein kultivierte Hefen im Betrieb zur Verwendung kommen. HANSEN beansprucht auch in dieser Beziehung das grosse Verdienst, den Weg gezeigt und eine Methode ausgearbeitet zu haben, welche es ermöglicht, das angestrebte Ziel zu erreichen. Die durchschlagenden Erfolge, welche in Alt-Carlsberg mit der rein gezüchteten Hefe erzielt wurden, haben schon viele Brauereien veranlasst, nur mit rein gezüchteter Hefe zu arbeiten, und sind im allgemeinen die Resultate zur Zufriedenheit ausgefallen, wenn nur die den Anforderungen an Vergärungsgrad und Geschmack entsprechenden Rassen der normalen Unterhefe gewählt wurden.

Möchte daher die Erkenntnis von dem Wert der rein gezüchteten Hefe in immer weitere Kreise dringen und so manches alte Vorurteil in Beziehung auf die Hefe überwunden werden; möchten doch auch die kleineren Brauereien, welche ja ohnedies mit manchen Schwierigkeiten zu kämpfen haben, sich der Überzeugung nicht verschliessen, dass mit der Einführung rein gezüchteter Hefe bei sonst richtig geleitetem Betrieb sich eine Reihe von Kalamitäten überwinden lässt. Die aufgewendeten Kosten werden reichliche Zinsen tragen."

In ähnlicher Weise spricht sich auch LOUIS MARX (Marseille)[2]) und A. FLÜHLER (Lyon)[3]) aus. —

---

1) Allg. Brauer- und Hopfenzeitung 1885.

2) Le laboratoire du brasseur. 1887. Siehe auch die Ausgabe von 1889.

3) Conférence faite à la société des sciences industrielles de Lyon. Section de Chimie. 1886.

Dr. REINKE, Laboratorienvorstand in der Versuchsstation für Brauerei an der Königlichen landwirtschaftlichen Hochschule Berlin giebt der Sachlage im Jahre 1888 den folgenden prägnanten Ausdruck[1]:

„Ohne das exakte Studium der bahnbrechenden HANSENschen Arbeiten und ohne deren Benutzung ist heute niemand imstande, die Konkurrenz in der Brauerei dauernd zu bestehen. Die HANSENschen Arbeiten haben in dem Brauereibetriebe, speziell in der Behandlung der Hefe, eine Umwälzung herbeigeführt."

In ähnlicher Weise haben die ersten Kapazitäten auf dem Gebiete der Zymotechnik sich ausgesprochen.

Die zahlreichen Versuche mit absolut reiner Oberhefe, welche zum ersten Male im Laboratorium des Verfassers angestellt wurden, haben gezeigt, dass die Entdeckungen HANSENs auch in diesem Zweige der Bierbrauerei ihre grosse Bedeutung haben. Das mit rein kultivierter obergäriger Hefe dargestellte Bier hat einen reineren, süsseren Geschmack und eine viel grössere Haltbarkeit als das gewöhnliche.

Selbstverständlich muss auch hier sorgfältig darüber gewacht werden, dass die Hefe in der Brauerei unter ganz reinlichen Verhältnissen entwickelt wird.

Die Produktion solcher leichten, alkoholarmen, obergärigen und wirklich haltbaren Biersorten hat gewiss in vielen bierbrauenden Ländern eine Zukunft für sich, namentlich wenn das Produkt in der wärmeren Jahreszeit eine bessere Qualität als bisher besitzt. Eine wesentliche Bedingung hierfür ist, nach den eingeholten Erfahrungen, eine reine Anstellhefe, und es wird sicherlich richtiger sein, wie es auch BĚLOHOUBEK für Böhmen hervorhebt, wenn die obergärigen Brauereien, statt teilweise ihren Betrieb für Untergärung einzurichten, eine zeitgemässe Entwickelung ihres Obergärungsbetriebes einführen und dadurch eine wirkliche Verbesserung dieses Produktes erzielen; als Produzenten untergäriger Biere können solche Brauereien in den wenigsten Fällen mit den schon bestehenden grossen Fabriken konkurrieren.

Über die Anwendung reingezüchteter obergäriger Hefe in Brauereien, welche nach englischer Art arbeiten, liegt ein

1) Chemiker-Zeitung 29. Dezember 1888 S. 1749.

Bericht aus Australien vom Herrn J. C. MAC CARTIE[1]) vor, worin mitgeteilt wird, dass eine grössere Zahl von Brauereien da schon seit einem Jahre die reingezüchtete Hefe allein benutzt haben und zwar mit den besten Resultaten. Nachdem einige Versuche mit Heferassen, die nicht gute Produkte gaben, gemacht waren, wurde die passende Rasse gefunden. MAC CARTIE schreibt hierüber: „Die reine Hefe[2]) giebt ein mildes, vollmundiges Bier, von grossem Glanz und Haltbarkeit, welches sich ganz besonders für Flaschenbiere eignet. Ich komme nun zu einer Sache, die für den Leser von Interesse sein wird. Herr DE BAVAY und ich lasen mit einiger Verwunderung die von einigen Wissenschaftsmännern in England gegebenen Berichte über die Schwierigkeit oder Unmöglichkeit eine Nachgärung zu erhalten, wenn nur eine einzige Hefenrasse des Saccharomyces cerevisiae benutzt wird; es war nämlich bei uns nicht die geringste Schwierigkeit damit verbunden, eine Nachgärung in den Lagerbieren zu erhalten, wo die australischen oder „Burton"-Hefen benutzt wurden. Ich habe mit Herrn DE BAVAY sehr viele Male sowohl „Stock" wie „bottled ales" untersucht, welche mit einer Reinkultur der Burton-Hefe vergoren waren, und keiner, der den Schaum und die Haube auf den Bieren sah, konnte zweifeln, dass sie sich in einer kräftigen Nachgärung befanden. Herr DE BAVAY teilt mir mit, dass er oft eine gut ausgeprägte Nachgärung im Laufe von 14 Tagen nach dem Klären (racking) des Bieres erhielt, und dies in solchen Fällen, wo die benutzte Hefe frisch vom Laboratorium kam und darum, praktisch gesprochen, frei von der geringsten Einmischung anderer Hefenrassen war."

MAC CARTIE zweifelt daher nicht daran, indem er sich auf diese Thatsachen stützt, dass HANSENs System auch für die Obergärung innerhalb weniger Jahre in allen hervorragenden Brauereien der Welt aufgenommen wird. Sein ausführlicher Bericht bietet besonders ein grosses Interesse dadurch, dass wir hier wieder einen von der Praxis geholten Beweis für die Verschiedenheiten der Rassen von Saccharomyces cerevisiae finden,

---

1) The Brewers' Journal. London 1889, Nr. 291, S. 489.

2) Eine „Burton"-Rasse, aus englischer Hefe im Laboratorium des Verfassers dieses Buches in Reinkultur dargestellt.

und also gleichzeitig eine neue dringende Aufforderung dazu, eine Auswahl zwischen diesen Rassen, mit Rücksicht auf die praktischen Anforderungen, zu treffen.

Ein Apparat im Gärungsbetriebe, welcher erst jetzt als Glied in HANSENs Hefereinzuchtsystem recht Bedeutung erhalten hat, ist der schon voran besprochene geschlossene Kühlapparat, welcher ermöglicht, die Würze im absolut reinen Zustande und mit passender Luftmenge versehen in die Bottiche hineinzuführen. Apparate zu diesem Zwecke eingerichtet wurden schon kurz nach der Publikation von PASTEURs Études von VELTEN konstruiert und zwar nach PASTEURs theoretischen Angaben, konnten aber bisher keine wirklich praktische Bedeutung erhalten, denn wozu nützte es, eine reine Würze zu haben, wenn man mit der Hefe die Krankheitskeime darin wieder hineinführen könnte? Die Bedingungen für den wirklichen Nutzen solcher Apparate sind erst jetzt gegeben, und die offenen Kühlschiffe werden daher in der kommenden Periode nach und nach verschwinden.

Die Frage: Wie lange hält sich eine Reinkultur in ihrem ursprünglichen, guten Zustande? — kann selbstverständlich nicht im Allgemeinen beantwortet werden. Wie erwähnt, besitzen die Rassen eine verschiedene Widerstandsfähigkeit gegen Infektion, und dieselbe Rasse hält sich nicht in demselben Zeitraume rein und gut in den ungleichen Gärungsräumen, wo sie verwendet wird. Dass die Jahreszeit hier auch eine Rolle spielt, und dass die Perioden des Jahres, wo die wilden Hefepilze, Bakterien und Schimmelpilze sich in grösster Menge in der Luft finden, besonders gefährlich sind, wissen wir. Wie bekannt, kann aber die Infektion auch zu anderen Zeiten des Jahres geschehen, namentlich durch Geräte, Fassgeläger u. s. w. Es ist daher nicht möglich, dieser Frage eine generelle für die Praxis verwendbare Erledigung zu geben. Dies hat aber weniger zu bedeuten, wenn wir erinnern, dass die Analyse immer die Ansteckung zeigen kann, lange bevor sie noch gefährlich ist, und dass eine neue Reinkultur derselben Hefe dann rechtzeitig eingeführt werden kann. Eine noch grössere Sicherheit gewährt natürlicherweise der kontinuierliche Betrieb des beschriebenen Hefepropagierungsapparats. Das Hauptresultat ist, dass man nun nicht länger aufs Geratewohl zu

arbeiten braucht, und nicht wie früher dem Zufalle seine Gärungen zu überlassen genötigt ist.

Dass HANSENs System eine vollständige Reform im Brauereibetriebe, was die Gärungen betrifft, hervorgerufen hat, ist jetzt eine allgemein anerkannte Thatsache; hierzu sind aber seine Wirkungen nicht begrenzt. Auf der Grundlage seiner Entdeckungen ist nämlich eine entsprechende Reform nun auch in Begriff sich in der Presshefefabrikation sowie in den anderen Zweigen der Gärungsindustrie den Weg anzubahnen.

---

# Litteratur.

**Adametz, L.**, Saccharomyces lactis, eine neue Milchzucker vergärende Hefeart. Centralblatt f. Bakt. 1889. Bd. V. Nr. 4.

**Ahlburg**, Über Aspergillus oryzae. Dinglers polyt. Journal 1878, 230 B. S. 330 und Mitt. d. deutschen Ges. f. Natur- und Völkerkunde Ost-Asiens. 1876. 16. Heft.

**Amthor, C.**, Studien über reine Hefen. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. XII. 1888.

— Über den Saccharomyces apiculatus. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. XII. 1888.

**Atkinson**, The chemistry of saké-brewing in Japan, the processes of preparation of Koji and of fermentation. Tokio. 1881.

**Aubry, L.**, Ein Beitrag zur Klärung und Richtigstellung der Ansichten über reine Hefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. München 1885, Nr. 7.

— Noch ein Wort über reine Hefe. Ibid. 1885, Nr. 12.

— Über desinfizierende Stoffe. Ber. d. Wiss. Stat. München 1887. 1889.

**Bainier, G.**, Observations sur les Mucorinées. Ann. d. sc. nat. Bot. Sér. VI, T. XV. 1883.

**Bary, De**, Über Schimmel und Hefe (Samml. gemeinverst. wissenschaftl. Vorträge) 1873.

— Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bakterien. Leipzig 1884.

— Vorlesungen über Bakterien. 2. Ausgabe. Leipzig 1887.

**Belohoubek, A.**, Studien über Presshefe. Prag 1876.

— Über den Einfluss der Hefe auf die Qualität des Bieres und über die Bedeutung der reinen Samenhefe für die Brauindustrie in Böhmen und Mähren. Vortrag. Böhm. Bierbrauer. Prag 1885.

— Einige Worte über den Bau und die Einrichtung der Brauereien. Prag 1875.

— Über die Obergärung von Bierwürzen. Prag 1881.

— Über die Erzeugung von Reisbier. Bay. Bierbr. 1870.

**Belohoubek, A.**, Über die Erzeugung von Presshefe in Kartoffelbrennereien. Österreichische Brennereizeitung. 1878.
(Dennoch eine Reihe von Abhandlungen betreffend d. Gärungen in der czekischen Sprache.)
**Billroth**, Untersuchungen über die Vegetationsformen von Coccobacteria septica. 1874.
**Blankenhorn** und **Moritz**, Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf die Gärung. Ann. d. Önologie 4. B. 1874.
**Bordas**, Sur une maladie nouvelle du vin en Algérie. Compt. rend. CVI, 1. 1888.
**Borgmann, E.**, Zur chemischen Charakteristik durch Reinkulturen erzeugter Biere. Fresenius, Zeitschrift für analytische Chemie, B. XXV. Heft 4.
**Bourquelot E.**, Sur la fermentation alcoolique du galactose. Compt. rend. CVI, S. 283. 1888.
**Boutroux**, Sur la fermentation lactique. Compt. rend. T. LXXXVI. 1874.
— Sur l'habitat et la conservation des levûres spontanées. Bull. de la soc. Linnéenne de Normandie. 3. sèr. 4. vol.
**Braeutigam, W.**, Untersuchungen über die Mikroorganismen in Schlempe und Biertrebern. Inaug.-Diss. Leipzig 1886.
**Brefeld**, Botan. Untersuchungen über Schimmelpilze. 1—4. Heft. Leipzig 1872 f.
— Mucor racemosus und Hefe. Flora 56. Jahrg. 1873.
— Über Gärung' I, II, III. Landw. Jahrbücher III., IV., V. Bd. 1874, 1875, 1876.
— Methoden zur Untersuchung der Pilze. Ber. d. mediz.-phys. Gesellsch. zu Würzburg. 1874.
— Beobachtungen über die Biologie der Hefe (Sitzb. d. Gesellsch. naturforschender Freunde zu Berlin. Bot. Ztg. 1875.
— Die Hefepilze. Leipzig 1883.
— Untersuchungen auf dem Gesamtgebiete der Mycologie. Forsetzung der Schimmel- und Hefepilze. 1888.
**Brejcha**, Mikrosk. Analyse des Kühlgelägers. Zeitschrift des Brauindustrie-Vereins f. d. K. Böhmen. 1879.
**Brown, A. J.**, The chemical action of pure cultivations of Bacterium aceti. Journ. chem. soc. 1886, S. 172.
— On an Acetic ferment which forms cellulose. Journ. chem. soc. 1886, S. 432.
**Brown, Horace T.** and **Morris, G. H.**, On the non chrystallisable products of the action of diastase upon starch. Journ. of the chemical society, August 1885.

**Buchner, Ed.**, Über den Einfluss des Sauerstoffes auf Gärungen. Zeitschr. f. phys. Chemie IX. 1885 S. 380.

**Büsgen**, Über Aspergillus Oryzae. Botan. Centralblatt. 1885. Jahrg. VI, Nr. 41, S. 62.

**Chodounsky**, Einige Blätter über Bier und Bierbrauerei. Prag 1886.

**Cienkowsky**, Die Pilze der Kahmhaut. Bull. d. Petersb. Akademie. 1873.

— Zur Morphologie der Bakterien. Mém. de l'acad. de St. Petersbourg. S. VII, T. XXV. 1877.

— Die Gallertbildungen des Zuckerrübensaftes. Charkow 1878.

**Cohn, F.**, Beiträge zur Biologie der Pflanzen. I. Bd., Heft 1—3. II. Bd., Heft 2 (Untersuch. über Bakterien).

— Über Schimmelpilze als Gärungserreger. Jahrb. der Schlesischen Gesellsch. f. vaterländ. Cultur zu Breslau. LXI, 1884, S. 226.

**David**, Über Rotweingärungspilze. Ann. d. Önologie. 4. Bd. 1874.

**Delbrück**, Die Säuerung des Hefengutes. Zeitschr. f. Spiritusindustrie. 1881.

— Der Charakter des Bieres, auch des Weissbieres. Woch. f. Brauerei. Berlin 1885, Nr. 6.

— Die Carlsberger reingezüchtete Hefe. Ibid. 1885, Nr. 10.

— Zur Wirkung der Kohlensäure-Entwickelung auf die Gärung. Ibid. 1886, Nr. 42.

**Dowdeswell**, On the occurrence of variations in the development of a Saccharomyces. Journ. Roy. soc. London. Ser. II, vol. V. 1885.

**Duclaux**, Mémoire sur la lait. Ann. de l'institut agronomique. 1882.

— Chimie biologique. Paris 1883.

— Fermentation alcoolique du sucre de lait. Ann. de l'instit. Pasteur. 1887, Nr. 12.

**Dünnenberger, C.**, Bakteriologisch-chemische Untersuchung über die beim Aufgehen des Brotteiges wirkenden Ursachen. Botan. Centralblatt. 1888. Bd. 33.

**Eidam**, Der gegenwärtige Standpunkt der Mykologie. 1871, 1872.

**Engel**, Les ferments alcooliques. 1872.

**Fitz**, Über Schizomyceten-Gärungen. Ber. d. deutschen chem. Gesellsch. Bd. 9—17. 1876—1884.

**Flügge**, Die Mikroorganismen. Leipzig 1886.

**Flühler, A.**, Conferénce faite à la société des sciences industr. de Lyon. Section de Chimie. 1886.

**Foth, G.**, Einfluss der Kohlensäure auf Gärung und Hefebildung. Wochenschrift für Brauerei. Berlin 1887. Bd. IV., S. 73 und S. 305.

**Frankland, P. F.**, New method for determining the number of micro organisms in air. Proc. Roy. soc. XLI, S. 443.

**Fresenius**, Beiträge zur Mycologie. 1850—63.

**Friedländer**, Mikroskopische Technik. 1884.

**Gayon**, Faits pour servir à l'histoire physiologique des moisissures. Mém. de la soc. des sciences phys. et naturelles de Bordeaux. 1878.

— Sur un procédé nouveau d'extraction du sucre des Mélasses. Ann. agronomique 1880.

**Gayon et Dupetit**, Sur un moyen nouveau d'empêcher les fermentations secondaires. Compt. rend. 1886, 8. Novbr.

**Gayon et Dubourg**, De la fermentation de la dextrine et de l'amidon par les Mucors. Ann. de l'inst. Pasteur. 1887. Nr. 11.

— Recherches sur la réduction des nitrates par les infiniment petits. Nancy 1886.

**Grawitz**, Beiträge zur systemat. Botanik der pflanzlichen Parasiten mit experimentellen Untersuchungen über die durch sie bedingten Krankheiten. Virchows Archiv, Bd. 70. 1877.

**Grotenfelt**, Studien über die Zersetzungen der Milch. Fortschr. d. Medizin. Jan.-Febr. 1889.

**Gruber, M.**, Eine Methode der Cultur anaërobischer Bakterien, nebst Bemerkungen zur Morphologie der Buttersäuregärung. Centralblatt f. Bakteriologie, 1887, S. 367 f.

**Grönlund**, Über Organismen in der Kühlschiffwürze. Allg. Z. f. Bierbr. und Malzfabr. Wien 1885.

— Über bitteren, unangenehmen Beigeschmack des Bieres.. Zeitschrift f. d. ges. Brauwesen. 1887.

**Haberlandt**, Das Vorkommen und die Entwickelung der sogenannten Milchsäurehefe. Wissenschaftl. prakt. Unters. auf dem Gebiete des Pflanzenbaues. 1875.

**Hansen, E. Chr.**, Les champignons stercoraires du Danemark. Résumé d'un mémoire publié dans les „Videnskbl. Meddelelser“ de la société d'histoire naturelle de Copenhague. 1876.

— Contributions à la connaissance des organismes qui peuvent se trouver dans la bière et le moût de bière et y vivre. Compt. rend. des: Meddel. fra Carlsberg Laboratoriet. Kopenhagen. Hagerups Buchhandlung. I. Bd., 2. H. 1879.

— Oidium lactis. Ebenda.

— Saccharomyces colorés en rouge et cellules rouges ressemblant à des Saccharomyces. Ebenda.

— Sur l'influence que l'introduction de l'air atmosphérique dans le moût qui fermente exerce sur la fermentation. Ebenda.

— Hypothèse de Horvath. Ebenda.

— Mycoderma aceti (Kütz.) Pasteur et Myc. Pasteurianum nov. sp. Ebenda.

**Hansen, E. Chr.**, Chambre humide pour la culture des organismes microscopiques. Compt. rend. des Meddel. fra Carlsberg Laboratoriet. I. Bd., 3. H. 1881.

— Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. I. Sur le Sacch. apiculatus et sa circulation dans la nature. Meddel. fra Carlsberg Laboratoriet. I. Bd., 3. H. 1881.

— Recherches sur les organismes qui, a différentes epoques de l'anné, se trouvent dans l'air, à Carlsberg et aux alentours, et qui peuvent se developper dans le moût de bière (II). Meddelelser fra Carlsb. Laborat. I. Bd., 4. H. 1882.

— Recherches sur la physiol. et la morphol. des ferments alcooliques. II. Les ascospores chez le genre Saccharomyces. III. Sur les Torulas de M. Pasteur. IV. Maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques. Meddel. fra Carlsb. Lab. II. Bd., 2. H. 1883.

— Bemerkungen über Hefenpilze. Allgem. Zeitschr. für Bierbrauerei und Malzfabrikation. 1883.

— Neue Untersuchungen über Alkoholgärungspilze (Monilia). Berichte d. deutschen botan. Gesellsch. 1884.

— Über das Zählen mikroskopischer Gegenstände in der Botanik. Zeitschr. für wissensch. Mikr. und mikroskop. Technik. Bd. I. 1884.

— Über Wiesners neue Prüfungsmethode der Presshefe. Dinglers polytechn. Journal 1884, S. 419.

— Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie. Vorläufige Mitteilung. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. München 1884.

— Einige kritische Bemerkungen über Dr. Hueppes Buch: „Die Methoden der Bakterienforschung." Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. und mikroskopische Technik. Bd. II. 1885.

— Om Renkulturer af Mikroorganismer. Bemaerkninger i Anledning af Dr. Salomonsens Bog: „Ledetraad for Medicinere i bacteriologisk Teknik." Nordisk medicinskt Arkiv. Bd. XVII. 1885.

— Vorläufige Mitteilungen über Gärungspilze. (Gelatin. Netzwerk. — Scheidewandbildung. — Sacch. apiculatus.) Botan. Centralblatt. Bd. XXI, Nr. 6. 1885.

— Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. V. Methodes pour obtenir des cultures pures de Saccharomyces et de microorganismes analogues. VI. Les voiles chez le genre Saccharomyces. Meddelelser fra Carlsb. Laboratoriet. II. Bd., 4 H. 1886.

— Über Hefe und Hefereinzucht. Zeitschr. f. Bierbr. und Malzfabr. Wien 1887 und in Bullet. de la Société d'encouragement pour l'industrie nationale. Paris 1887.

**Hansen, E. Chr.**, Über rot und schwarz gefärbte Sprosspilze. Allg. Brauer- und Hopfenzeitung. Nürnberg 1887, Nr. 95.
— Noch ein Wort über den Einfluss der Kohlensäure auf Gärung und Hefebildung. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. München 1887. Nr. 13, S. 304.
— Neue Bemerkungen zu Foths Abhandlung: „Einfluss der Kohlensäure auf Gärung und Hefebildung.“ Wochenschr. f. Brauerei. Berlin. IV, 1887, S. 378.
— Methode zur Analyse des Brauwassers in Rücksicht auf Mikroorganismen. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. München 1888. Nr. 1.
— Über die zymotechnische Analyse der Mikroorganismen der Luft. Prager Brauer- und Hopfenzeitung. Prag 1888. Nr. 19.
— Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie. I. Heft. München (Oldenbourgs Verlag) 1888.
— Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. VII. Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre. Meddel. fra Carlsb. Laborat. II. Bd. 5. H. 1888.
— Recherches faites dans la pratique de l'industrie da la fermentation. I. Introduction. II. Culture pure de la levûre au service de l'industrie. III. Observations faites sur les levûres de bière. IV. Sur l'examen pratique, au point de vue de la conservation, de la bière contenue dans les tonneaux des caves de garde. Meddelels. fra Carlsb. Labor. II. Bd. 5 H. 1888.
— Über die im Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenk. 1889. V. Bd.
— Some points in connexion with practical brewing: I. On the bacteriological analysis of the water and the air for brewing purposes. II. On my system of pure yeast-culture and its application in breweries with top fermentation. (Transact. of the Laboratory Club. London 1889.)
**Harz**, Untersuch. über die Alkohol- und Milchsäuregärung. Z. der allg. österr. Apotheker-Vereins 1870/71.
— Grundzüge der alkoholischen Gärung. München 1877.
**Hayduck**, Über die Existenz von Hefenrassen mit konstant sich erhaltenden Eigenschaften. Wochenschr. f. Brauerei Nr. 20. Berlin 1885.
— Über Milchsäuregärung. Wochenschr. f. Br. 1887, Nr. 17.
**Hesse**, Über quantitative Bestimmung der in der Luft enthaltenen Mikroorganismen. Mitteil. d. K. Gesundheitsamtes. Bd. II. 1884.
**Hitschcock**, Studies of atmosphéric dust. Amerik. monthly microscop. Journal I. 1880.
**Holm, J. Chr.**, Die Vorrichtungen in der Brauerei zur Kühlung und Lüftung der Würze. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 1887, Nr. 20.

**Holm, J. Chr.**, Ältere und neuere Ansichten über Oberhefe und Unterhefe. Deutscher Brauer- und Mälzer-Kalender. 1886/87.

**Holm et Poulsen**, Jusqu'a quelle limite peut-on, par la methode de M. Hansen, constater une infection de „levûre sauvage“ dans une masse de levûre basse de Saccharomyces cerevisiae? Meddel. fra Carlsberg Laboratoriet. 2. Bd., 4. H. Kopenhagen, Hagerups Buchhandlung. 1886.

— Jusqu'a quelle limite etc. Deuxième Communicat. Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet. 2. Bd., 5. H. 1888.

**Horvath**, Über den Einfluss der Ruhe und der Bewegung auf das Leben. Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie, Bd. 17. 1878.

**Hueppe, F.**, Untersuchungen über die Zersetzungen der Milch durch Mikroorganismen. Mitt. d. K. Gesundheitsamtes. Bd. II. 1884.

— Die Methoden der Bakterienforschung. 1889.

**Jacobsen, J. C.**, Über die Carlsberger reingezüchtete Hefe. Wochenschr. für Brauerei Nr. 10. Berlin 1885.

**Jaquemin, G.**, Du Saccharomyces ellipsoideus et de ses applications industrielles à la fabrication d'un vin d'orge. Compt. rend. T. CVI. Nr. 10. 1888.

**Jodlbauer, M.**, Über die Anwendbarkeit der alkoholischen Gärung zur Zuckerbestimmung. Z. f. Rübenzuckerindustrie. 1888. Nr. 15.

**Jörgensen, Alfred**, Zur Analyse der Presshefe. Dinglers polytechn. Journal. 1884. Bd. 252, S. 424.

— Über die Entwickelung der Gärungsphysiologie in den letzten Jahren mit spezieller Berüsksichtigung der Brauindustrie. Allg. Brauer- u. Hopfenzeitung. Nr. 2, 3, 4. Nürnberg 1885.

— Über das Verhältnis der Alkohol-Fermentorganismen gegenüber der Saccharose. Ibid. 1885, Nr. 20.

— Giebt es verschiedene Rassen der sogenannten Saccharomyces cerevisiae? Ibid. 1885, Festnummer.

— Vorläufiger Bericht über Versuche im grossen mit absolut reiner Oberhefe, nach Hansens Methode dargestellt. Allg. Zeitschr. für Bierbr. und Malzfabr. Wien 1885. Nr. 36.

— Reingezüchtete Oberhefe. Allg. Brauer- und Hopfenztg 1886. Nr. 8.

— Ein Beitrag zur Präzisierung der Hefenfrage. I—II. Allg. Zeitschr. für Bierbr. und Malzfabr. Wien 1885.

— Om Gjaeringsphysiologiens Udvikling i de senere Aar, saerligt med Hensyn til Ölgjaeringsindustrien. Teknisk Tidskrift. Stockholm 1885.

— Über den Unterschied zwischen Pasteurs und Hansens Standpunkt in der Hefenfrage. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. München 1888.

**Jörgensen, Alfred,** Neue Bemerkungen über die Kulturmethoden und die Analyse der Hefen. Z. f. d. g. Brauw. München 1888.

— Brefelds neue Hefenuntersuchungen. Allg. Brauer- und Hopfenztg. Nürnberg 1888. Nr. 74.

— Die zymotechnische Wasser-Analyse in Hueppes Buch: Die Methoden der Bakterienforschung. 4. Aufl. 1889. Centralblatt für Bakteriologie. 1889. V. Bd., Nr. 22.

— Die Anwendung der nach Hansens Methode reingezüchteten obergärigen Hefe in der Praxis. Brauer- und Mälzer-Kalender für Deutschland und Österreich. 1889/90.

**Kern,** Über ein Milchferment des Kaukasus. Bot. Zeitg. 1882. Biolog. Centralblatt 1882.

**Klebs, J.,** Über fraktionierte Kultur. Archiv f. experiment. Pathologie. Bd. I.

**Klein, E.,** Mikro-organisms and disease. London 1884.

**Klein, L.,** Botan. Bakterienstudien (Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. Bd. VI. 1889) Nr. 12—14.

**Knierim, W. v.** und **Ad. Mayer,** Über die Ursache der Essiggärung. Die landw. Versuchsstat. Bd. XVI. 1873.

**Koch, R.,** Verfahren zur Untersuchung, zum Konservieren und Photographieren der Bakterien. Beitr. z. Biol. II.

— Über Desinfektion. Mitt. d. K. Gesundheitsamtes. 1881.

— Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mitt. d. K. Gesundheitsamtes. Bd. I. Berlin 1881.

**Krasser,** Über das angebliche Vorkommen eines Zellkerns in den Hefenzellen. Österr. botan. Zeitschr. 1885. Nr. 11.

**Kukla, A.,** Die heurigen trüben Biere[1]. Bericht der Versuchsanstalt für Brauindustrie in Böhmen. Prager Brauer- u. Hopfenztg. Prag 1889.

**Laer, H. van,** Note sur les fermentations visqueuses[1] (Mémoires couronnés et autres mémoires publ. par l'Académie royale de Belgique. T. XLIII, 1889).

**Liborius, P.,** Beiträge zur Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien. Z. f. Hygiene. I Bd., 1. H. Berlin 1886.

**Lindner, P.,** Über rot und schwarz gefärbte Sprosspilze. Wochenschr. f. Br. Nr. 44. Berlin 1887.

— Die Askosporen und ihre Beziehungen zur Konstanz der Hefenrassen. Wochenschr. f. Br. Nr. 39. 1887.

1) Ich bedauere, dass ich diese Arbeit nicht mit in den Text aufnehmen konnte, weil der Druck meines Buches bei ihrem Erscheinen schon begonnen war.

**Lindner, P.**, Nachweis von Mikroorganismen in der Luft von Gärungsbetrieben. Wochenschr. f. Br. 1887.
— Über ein neues, in Malzmaischen vorkommendes, Milchsäure bildendes Ferment. Wochenschr. f. Br. 1887. Nr. 23.
— Über einige Gärversuche mit verschiedenen Hefen. Wochenschr. f. Br. 1888. Nr. 14.
— Das Langwerden der Würze durch Dematium pullulans. Wochenschr. f. Br. 1888. Nr. 15.
— Verändert sich der Charakter einer Brauereihefe bei fortgesetzter Kultur unter veränderten Ernährungsbedingungen? Wochenschr. f. Br. 1888. Nr. 3.
— Die Sarcina-Organismen der Gärungsgewerbe. Berlin 1888.
**Laurent, C.**, La Bactérie de la fermentation panaire. Bull. de l'acad. roy. de Belgique. T. X., Nr. 12. 1885.
**Lintner, C.**, Lehrbuch der Bierbrauerei. 1878.
— Zymotechnische Rückblicke auf das Jahr 1884. Zeitsch. f. d. ges. Brauw. München 1885, S. 399.
**Löw, E.**, Über Dematium pullulans. Pringsh. Jahrb. Bd. VI.
**Maercker, M.**, Handbuch der Spiritusfabrikation. 5. Auflage. Berlin 1890.
**Marx, L**, La levûre pure de brasserie. Revue universelle de la brasserie et la malterie. 1885. Nr. 622.
— Le laboratoire du brasseur. Paris 1889.
— Les levûres des vins. Moniteur scientific du Dr. Quesneville. Paris 1888.
**Matthews**, On the red mould of barley. Journal of the Roy. micr. soc. London 1883.
**Mayer, A.**, Lehrbuch der Gärungschemie.
— Die Lehre von den chemischen Fermenten. Heidelberg 1882.
**Miflet**, Untersuchungen über die in der Luft suspendierten Bakterien. Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. 3. Bd. 1879.
**Miquel**, Études sur les poussières organisées de l'atmosphère. Annuaire de l'observ. de Montsouris pour l'an 1879.
— Nouvelles recherches sur les poussières organ. de l'atmosph. Ann. de l'obs. Montsouris. 1880.
— Étude général sur les bactéries de l'atmosphère. Extrait de l'annuaire de Montsouris. 1881.
— Études générales des bactéries de l'atmosphère. Ann. de l'observ. Montsouris. 1882.
— Des organismes vivants de l'atmosphère. Paris 1883.
— Dixième mémoire sur les poussières organisées de l'air et des eaux (Annuaire de Montsouris pour 1888).

**Miquel**, De l'analyse microscopique de l'air au moyen de filtres solubles. Ann. de micrographie. Paris 1889, S. 153[1]).

**Morris**, The pure culture of micro-organisms, with special reference to yeast. Journ. Soc. Chem. Industry 1887, Nr. 2.

**Münz**, Recherches sur les Fonctions des Champignons. Compt. rend. T. 80. 1875.

**Nägeli**, Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infektionskrankheiten. München 1877.

— Theorie der Gärung. 1879.

— Über die Bewegungen kleinster Körperchen. Sitzb. d. math.-phys. Klasse d. Akad. d. Wissensch. München 1879.

— Untersuchungen über niedere Pilze. München 1882.

**Olsen, Johan**, Er Sublimat i en Fortynding af 1 pro Mille et paalideligt Desinfektionsmiddel? Nyt Magasin for Laeger XIV. B. Kristiania 1884.

**Pasteur, L.**, Études sur le vin. 1866.

— Études sur le vinaigre. 1868.

— Études sur le bière. 1876.

— Note sur la fermentation des fruits et sur la diffusion des germes des levûres alcooliques. Compt. rend. T. 83, 1876, S. 173.

— Examen critique d'un écrit posthume de Claude Bernard sur la fermentation alcoolique. Lecture faite à l'académie de Médecine le 26. Novbr. 1878.

**Pedersen, R.**, Recherches sur quelques facteurs, qui ont de l'influence sur la propagation de la levûre basse du Sacch. cerevisiae. Meddel. fra Carlsb. Laborat. 1878.

— Sur l'influence, que l'introduction de l'air atmospherique dans le moût qui fermente exerce sur la fermentation. Meddel. fra Carlsb. Labor. 1878.

**Petersen, A.**, Einige Bemerkungen über das Lüften der Würze. Zeitschr. f. d. g. Brauw. München 1888.

**Prazmowski**, Untersuchungen über die Entwickelungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten. Leipzig 1880. (Clostr. butyric.)

**Reess**, Botan. Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze. 1870.

— Über den Soorpilz. Sitzungsber. der physikalisch-med. Societät Erlangen. Botan. Zeitg. 1878.

**Reinke**, Über Sarcina. Wochenschr. f. Brauerei. 1885, 1886.

1) Diese Abhandlung, worin Miquel die neuesten Verbesserungen in der Analyse der Mikroorganismen der Luft mitteilt, kam mir leider erst nach Abschluss des Manuskriptes zu Händen.

**Richet**, De quelques conditions de la fermentation lactique. Comptes rend. hebdom. 1879. Bd. 88.

**Salamon, Gordon**, Cantor Lectures on yeast. London 1888.

**Schmitz**, Resultate der Untersuchungen über die Zellkerne der Thallophyten. Separat-Abdruck d. Sitzungsb. der niederrhein. Ges. f. Natur- und Heilkunde. Bonn 1879. S. 18.

**Schützenberger**, Die Gärungserscheinungen. Leipzig 1876.

**Schumacher**, Beiträge zur Morphologie und Biologie der Hefe. Sitzungsber. d. K. K. Akad. d. Wiss. Wien 1874.

**Seynes, J. de**, Sur le mycoderma vini. Comptes rendus hebd., T. LXVII. 1868. Ann. d. sc. nat. Botanique V. Série X. 1869.

**Soyka**, Über den Übergang von Spaltpilzen in der Luft. Sitzungsber. der math.-phys. Klasse der Akademie der Wissensch. zu München. Bd. IX. 1879.

**Thausing**, Die Theorie und Praxis der Malzbereitung und Bierfabrikation. Leipzig 1888.

— Über reingezüchtete Hefe. Allg. Zeitschr. f. Bierbr. und Malzfabrik. S. 755. Wien 1885.

**Tieghem, Ph. van**, Sur le Bacillus Amylobacter et son rôle dans la putrefaction des tissus végétaux. Bull. de la soc. bot. de France. 1877.

— Premier mémoire sur les mucorinées.

— Second mémoire sur les mucorinées.

— Troisième mémoire sur les mucorinées. Ann. d. sc. nat. Bot. Sér. VI. T. IV. 1878.

— Leuconostoc mesenterioides. Ann. d. sc. nat. Sèr. VI. T. 7.

**Traube**, Theorie der Fermentwirkungen. Berlin 1858. Ber. d. d. chem. Gesellsch. 1874, 1876.

**Tyndall**, Essays on the floating matter in the air in relation to putrefaction and infection. London 1881.

— Further researches on the deportment and vital persist. of putrefact. and infect. organisms. London 1877-78.

**Velten**, Conférence. Revue universelle de la brasserie et malterie. Nr. 742 et 743. 1888.

**Vuylsteke**, Contribution à l'étude des Saccharomyces fermentant en concurrence. (Ann. de micrographie, Ann. II, 1889, Nr. 5.) „Deutsch in Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 1888, Nr. 24 und 1889, Nr. 1.

**Wichmann, H.**, Die Hefereinkultur und die Bakterienfrage. Mitteilungen der österreichischen Vers.-Stat. für Brauerei und Mälzerei in Wien. 1. H. 1888. S. 64.

**Wichmann, H.** und **Rohn, S.**, Über Bierfiltration. Ebenda, S. 79.

**Wiesner**, Untersuchungen über den Einfluss, welchen Zufuhr und Ent

ziehung von Wasser auf den Hefezellen äussern. Sitzb. d. Wiener Akademie. 1889. Bd. 59.

**Wiesner**, Bedeutung der technischen Rohstofflehre (techn. Waarenkunde) als selbstständiger Disziplin und über deren Behandlung als Lehrgegenstand an techn. Hochschulen. Dinglers polytechnisches Journal. Bd. 237. 1880.

**Will, H.**, Wie wird reine Hefe gezüchtet? Z. f. d. ges. Brauwesen. München 1885. Nr. 9.

— Über einige für die Brauindustrie wichtige Hefenarten und deren Unterscheidungsmerkmale. Allg. Brauer- und Hopfenzeitg. 1885. Festnummer.

— Über Sporen- und Kahmhautbildung bei Unterhefe. Z. f d. ges. Brauwesen. 1887, Nr. 16.

— Über das natürliche Vorkommen von Sporenbildung in Brauereien. Z. f. d. ges. Brauwesen. 1887. Nr. 17.

— Untersuchungen über die Mikroorganismen der Tropfsäcke. Ber. d. Wiss. Stat. München 1887.

— Über eine wilde Hefe, welche dem Biere einen bitteren Geschmack giebt. In Ber. d. wissensch. Stat. München 1889.

**Winogradsky**, Über die Wirkung äusserer Einflüsse auf die Entwickelung von Mycoderma vini. Bot. Centralblatt. 1884, Bd. XX, S. 165.

**Wortmann**, Untersuch. über das diastat. Ferment der Bakterien. Z. f. physiol. Chemie. Bd. VI. 1882.

**Yung**, Des poussières organisées de l'atmosphère. Arch. des sc. phys. et nat. T. IV. Genève 1880.

**Zalewsky**, Über Sporenbildung in Hefezellen. Verh. d. Krakauer Akad. d. Wiss. Math.-naturw. Sektion I. Bd. XII. 1885. Ref. Bot. Centr. Bd. XXV.

**Zopf, W.**, Entwickelungsgesch. Untersuch. über Crenothrix polyspora. Berlin 1879.

— Über den genetischen Zusammenhang der Spaltpilzformen. Sitzb. d. Berliner Akad. d. Wiss. 1881.

— Zur Morphologie der Spaltpflanzen. Leipzig 1882.

— Über Bacterium merismopedioides. Sitzb. des bot. Ver. d. Prov. Brandenburg. Juni 1882.

— Die Spaltpilze. Breslau. 3. Ausg. 1885.

— Oxalsäuregärung (an Stelle von Alkoholgärung) bei einem typischen (endosporen) Saccharomyceten, Sacch. Hansenii n. spec. Bericht d. d. bot. Gesellsch. 1889. Bd. VII, H. 2.

— Die Pilze. Handbuch der Botanik. IV Bd. Breslau 1889.

---

# Namen- und Sachregister.

